Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Untersuchungen zur Stabilität einiger klinisch-chemisch relevanter Enzyme gegenüber mechanischer Erschütterung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Johannes Wertz
aus Stuttgart
1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0012

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Untersuchungen zur Stabilität einiger klinisch-chemisch relevanter Enzyme gegenüber mechanischer Erschütterung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Johannes Wertz
aus Stuttgart
1981

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Inhalt

			Seite
A		Einleitung	5
B		Allgemeiner Teil	6
	1.	Betrachtungen zur Stabilität	6
	2.	Eigenschaften der verwendeten Enzyme	13
	2.1.	GOT	13
	2.2.	GPT	18
	2.3.	LDH	20
	2.4.	CK	29
	2.5.	AP	36
	2.6.	G6P-DH	39
	2.7.	AK	41
C		Experimenteller Teil	45
	1.	Material und Methoden	45
	1.1.	Geräte	45
	1.2.	Enzyme	46
	1.2.1.	GOT	46
	1.2.2.	GPT	46
	1.2.3.	LDH	46
	1.2.4.	CK	47
	1.2.5.	AP	47
	1.2.6.	G6P-DH	48
	1.2.7.	AK	48
	1.3.	Seren	49
	1.4.	Aktivitätsbestimmungen	49
	1.5.	Variationsstatistische Betrachtungen	54

		Seite
2.	Ergebnisse	59
2.1.1.	GOT	59
2.1.2.	GPT	60
2.1.3.	LDH	60
2.1.4.	CK	61
2.1.5.	AP	62
2.1.6.	G6P-DH	62
2.1.7.	AK	63
2.2.	Tabellen	64
2.3.	Abbildungen	80
D	Diskussion	88
E	Zusammenfassung	106
F	Ausblick	109
G	Literaturverzeichnis	113
H	Abkürzungsverzeichnis	158

A. Einleitung

Kenntnisse über Stabilität und Haltbarkeit von Serumproben und der darin enthaltenen Enzyme sind wichtig, um beträchtliche Fehler bei der Interpretation der Enzymaktivitäten zu vermeiden. Die Forschungsergebnisse über Enzymstabilitäten in vitro sind höchst unterschiedlich. Leider gibt es nur wenige vergleichende Untersuchungen.

Serumproben sind beim Transport und während der Bestimmung im klinisch-chemischen Labor mechanischen Kräften und Erschütterungen ausgesetzt, z.B. durch Mischen mit anderen Reagenzien, Pumpen in den modernen Analyseautomaten oder Zentrifugation. Crasser (1980) berichtet über starken Aktivitätsverlust durch Schütteln von Adenylatkinase, während Hoffmeister und Junge (1970) und Feissli et al. (1966) bei anderen Versuchsbedingungen und anderen Enzymen (z.B. Lactat-Dehydrogenase und Transaminasen) nur unwesentliche erschütterungsbedingte Haltbarkeitseinbußen feststellen konnten.

Das Ziel dieser Arbeit ist, bei Serumenzymen, die wichtig sind in der Diagnose von Herz-, Leber- und Skelettmuskelerkrankungen,

wie Glutamat - Oxalacetat - Transaminase (E.C.2.6.1.1)
Glutamat - Pyruvat - Transaminase (E.C.2.6.1.2)
Lactat - Dehydrogenase (E.C.1.1.1.27)
Creatin - Kinase (E.C.2.7.3.2)
Alkalische Phosphatase (E.C.3.1.3.1)
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (E.C.1.1.1.49)
und Adenylatkinase (E.C.2.7.4.3),
die Empfindlichkeit gegenüber mechanischer Erschütterung zu prüfen und vergleichend zu diskutieren. Dabei wird als Maß für die Stabilität die biologische Aktivität der Enzyme in physiologischer Kochsalzlösung bzw. in Serumproben im optischen Test gemessen.

B. Allgemeiner Teil

1. Betrachtungen zur Stabilität

Unter Denaturierung versteht man die Veränderung der nativen, also dem physiologischen Zustand entsprechenden, dreidimensionalen Anordnung einer Polypeptidkette zu einer weniger geordneten Struktur. Dabei ändern sich Sekundär- und Tertiärstruktur, die Primärstruktur bleibt aber intakt (Joly, 1965). Enzyme sind relativ labile, hochmolekulare Proteine, die ihre spezifische biologische Wirksamkeit, sogar während sanfter Änderungen der Umgebungsbedingungen, durch Denaturierung

einbüßen können. Da die exakte chemische Konfiguration nicht bekannt ist, kann Denaturierung nur durch bestimmte experimentelle Kriterien festgestellt werden, wie Abnahme der Löslichkeit, Änderung der physikochemischen Eigenschaften, steigende Empfindlichkeit für enzymatische Hydrolyse und Abnahme der biologischen Aktivität.

Bei der Denaturierung nimmt die strenge Ordnung der Peptidkette und der Seitenketten in der nativen Raumstruktur ab, aber die Ordnung des umgebenden Wassers kann durch Aufbau einer Hülle um freigesetzte hydrophobe Seitenketten zunehmen, so daß dieser Effekt überkompensiert wird. Stabilisierungen der denaturierten Form durch neue hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken sind allerdings möglich (Nozaki and Tanford, 1963).

Die Stabilität gegenüber Denaturierung hängt größtenteils von den strukturellen Besonderheiten des Proteins und dessen Primärstruktur ab. So sind zum Beispiel die unterschiedlichen Denaturierungsempfindlichkeiten von Mensch-, Kaninchen- und Rinderhämoglobin bei 2 $^{\circ}$C gegenüber Alkali verschiedenen Graden von Komplementarität eines nicht polaren Musters auf der Globin-Oberfläche zugeschrieben worden; dabei dürfte

geringe Alkali-Sensitivität auf enge räumliche Nachbarschaft zwischen Häm und Globin hinweisen (Haurowitz et al., 1954). Die Stabilität des Proteins ist jedoch auch abhängig von den auf das Protein einwirkenden Faktoren wie physikalische, chemische und biologische Denaturantien.

Hitze, Kälte, Bestrahlung und mechanische Kräfte rechnen zu den physikalischen Denaturantien.

Denaturierung wird bei steigenden Temperaturen erleichtert; die meisten Enzyme werden bei Temperaturen über dem physiologischen Bereich inaktiviert. Als Zielscheibe dienen bei der Hitzedenaturierung vor allem die Wasserstoffbrückenbindungen. Durch die zunehmende thermische Bewegung und die abnehmende Lösungsmittelstruktur entstehen hoch ungeordnete Strukturen und auch Aggregate durch irreversible kovalente Modifikationen wie zum Beispiel intermolekulare Disulfidbrücken (Tanford, 1968). Durch Kälte wird die Lösungsmittelstruktur geändert. Diskutiert werden Konformationsübergänge, bedingt durch geringere hydrophobe Interaktionen bei niederer Temperatur (Brandts, 1969), Dissoziation der Quartärstrukturen (Chilson et al., 1965 b) und Aggregatbildung (Cowman and Speck, 1969). Strukturelle Änderungen bedingt durch Dehydration nach Frieren könnten eine wichtige Rolle spielen (Darbyshire, 1975).

Im allgemeinen wird angenommen, daß Enzympräparationen zwischen $0^{\circ}C$ und $4^{\circ}C$ am stabilsten sind (Bergmeyer, 1962, 1977). Dies könnte davon herrühren, daß proteolytische Enzyme, die in den meisten Enzympräparationen vorhanden sind, in der Kälte nur geringe Aktivität zeigen (Schmid, 1979).

Enzyme können durch mechanische Kräfte, wie hoher orthostatischer (Hüttenrauch und Keiner, 1976) oder hydrostatischer Druck (Penniston, 1971), Ultraschall (Pritchard et al., 1966; Thacker, 1973), Scherkräfte (Tirell and Middleman, 1975, 1978; Charm and Wong, 1970) und durch mechanische Vibration in vivo (Miszczak et al., 1974; Tsvetkov and Popov, 1973) denaturiert werden.

Oligomere Enzyme unter hoher Druckeinwirkung werden durch Dissoziation in ihre Monomere inaktiviert (Penniston, 1971).

Denaturierung durch Ultraschall ist wahrscheinlich durch Oberflächeninaktivierung bedingt (Dietrich, 1962).

Wegen der Photooxidation durch Bestrahlung von empfindlichen Gruppen wie Cystein, Tryptophan, Histidin und von Peptidbindungen müssen Proteine vor Lichteinwirkung geschützt werden (Grossweiner, 1976).

Chemische Denaturantien sind Säuren, Alkali, organische Wasserstoffbrückenbildner, Neutralsalze, organische Lösungsmittel, schwere Metalle, chelierende Agentien und Surfactants.

Bei Denaturierung durch Säure entsteht durch Protonierung an den im Innern des Moleküls verborgenen ungeladenen Gruppen wie zum Beispiel Histidin oder Peptidgruppen eine Abnahme der ionischen Interaktionen und auf diese Weise eine vollständige Denaturierung (Tanford, 1968).

Durch einen ähnlichen Mechanismus werden bei der Denaturierung durch Alkali verborgene Tyrosyl-, Cystein- oder Cystingruppen exponiert (Tanford, 1968).

Stoffe wie Harnstoff, Guanidiumhydrochlorid oder Formamid sind starke Proteindenaturierungsmittel, die wahrscheinlich stärker als Wasser mit den strukturformenden Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb und zwischen den Seitenketten in Wettbewerb treten. Die für die native Proteinstruktur notwendigen Wasserstoffbrückenbindungen werden reduziert(Tanford, 1968).

Neutralsalze wirken auf polare und nichtpolare Gruppen und haben Einfluß auf die Löslichkeit der Proteine. Sie können, abhängig von Konzentration und Proteinkonformation, stabilisierend oder denaturierend wirken (Dixon and Webb, 1979).

Die meisten nichtwässrigen Lösungsmittel bewirken ein Auffalten der nativen Proteinstruktur durch Solvation von im Molekülinnern liegenden nicht-polaren Resten. Es enstehen hochgeordnete Peptidketten mit großen Helixregionen (Tanford, 1968).

Schwere Metalle können wichtige Gruppen maskieren;chelierende Agentien substituieren Liganden oder entfernen Metallkationen und wirken so inaktivierend auf das Enzym (Vallee and Ulmer, 1972).

Cystein, Methionin und Tryptophan sind empfindlich gegenüber photochemischer (Westhead, 1972) oder chemischer Oxidation wie H_2O_2(Cohen, 1968).

Surfactants wirken hauptsächlich auf hydrophobe Bezirke und, zusätzlich bei ionischen Surfactants, auf geladene Gruppen ein. Die Interaktion zwischen Proteinen und Surfactants hängt von Konzentration, Struktur und Versuchsbedingungen (pH, Temperatur) ab (Tanford, 1968). Nach Schmidt und Schmidt (1963) fällt die katalytische Aktivität von Lactat - Dehydrogenase in Serum, in sorgfältig gereinigten Gefäßen bei + 4° C aufbewahrt, innerhalb von 48 Stunden nur auf 96 % ab, in Gefäßen mit Spuren von Detergentien hingegen auf 62 %.

Enzyme sind empfindlich gegen biologische Denaturantien (Proteasen), abhängig von Konformation,

Größe, Ladung und Struktureigenschaften wie an der Oberfläche gelegene hydrophobe Aminosäuren. Helixgehalt und Anzahl der Disulfidbindungen (Goldberg and St. John, 1976; Goldberg and Dice, 1974). Normalerweise geht Denaturierung dem Abbau durch Proteasen voraus (Okunuki, 1961).

Bei allen diesen denaturierenden Einflüssen können wir eine Auffaltung zur völligen ungeordneten Form (random coil) nicht erwarten. Häufig wird das aufgefaltete Protein durch Bildung neuer Wasserstoffbrücken, neuer hydrophober Bindungen - vor allem zwischen mehreren Proteinmolekülen - und neue Hydrathüllen in metastabile Zustände kommen: Das Protein durchläuft analog einem Phasenübergang eine Vielzahl von Konformationen (Lumry and Eyring, 1954; Schmid, 1979). Deshalb kehren viele Proteine nach Beseitigung des denaturierenden Einflusses wieder in ihre native Konformation zurück. Die Denaturierung wird dann als reversibel bezeichnet. Aus vielen metastabilen Zuständen wird jedoch das aufgefaltete Proteinmolekül nicht mehr in die native Konformation gelangen. Die Denaturierung ist dann irreversibel. Reversible Denaturierung wurde manchmal als Veränderung der Tertiärstruktur beschrieben, irreversible Denaturierung als Veränderung in der Sekundärstruktur (Joly, 1965). Enthält das Molekül mehrere Disulfid-

brücken, so ist die Auffaltung bis zur völlig regellosen Struktur nicht möglich. Damit wird die Rückkehr zur nativen Struktur erleichtert. Befinden sich am Protein oder im Medium aber zusätzliche SH-Gruppen, so kann es während der Denaturierung sehr leicht zu einem Disulfid-Austausch kommen; durch diese Fixierung wird die Denaturierung irreversibel (Fasold, 1972).

2. Eigenschaften der verwendeten Enzyme

2.1. Glutamat-Aspartat-Transaminase

GOT (2.6.1.1.) gehört zu den Transferasen bzw. Aminotransferasen, die wechselseitige Aminierung und Desaminierung zwischen Ketosäuren und der Glutaminsäure bewirken, ohne daß freies Ammoniak auftritt. Die Transaminierung spielt beim biochemischen Auf- und Abbau der Eiweißstoffe eines besondere Rolle. GOT hat eine weite Verbreitung und wurde erstmals von Braunstein und Kritzmann (1937) aus Schweineherzmuskel angereichert.

Das Enzym katalysiert die Reaktion

Aspartat + α-keto-glutamat $\rightleftharpoons$ Glutamat + Oxalacetat

(Barman, 1969).

Das Molekulargewicht des Enzyms aus Schweineherz beträgt 93 147 inclusive der 2 Mol Pyridoxalphosphat (Ovchinnikov et al., 1973). Serum-GOT besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit je 412 Aminosäuren.Das Lysin in Position 258 bindet covalent mit dem Coenzym Pyridoxal-5'-Phosphat. Funktionell wichtig ist auch das Tyrosin in Position 40. Die Bindung des Coenzyms ist relativ labil (Hoppe-Seyler und Thierfelder, 1966).

Serum-GOT enthält: 4,6% Lysin, 1,9% Histidin, 6,3% Arginin, 4,9% Asparagin, 5,3% Asparaginsäure, 6,0% Threonin, 6,3% Serin, 3,9% Glutamin, 6,0% Glutaminsäure, 5,8% Prolin, 6,7% Glycin, 7,7% Alanin, 1,2% Cystein, 7,0% Valin, 1,4% Methionin, 4,6% Isoleucin, 9,2% Leucin, 2,9% Tyrosin, 5,6% Phenylalanin, 2,2% Tryptophan (Ovchinnikov et al.,1973). Das Enzym enthält 7 leicht titrierbare und einige maskierte SH-Gruppen/Mol (Torchinskii and Braunshtein, 1963). Lysin ist im aktiven Zentrum (Hughes et al., 1962). Polyanovskii et al. (1970) beschreiben das Molekül als Stab, der angenähert werden kann in der Form eines starren Rotationsellipsoids mit Achsenverhältnis a/b= 1:3. Sie nehmen ein hypothetisches Strukturmodell an. Dabei sind die Untereinheiten durch

laterale, nicht kovalente Bindungen verknüpft, die Rotation ausschließen. Die Untereinheit selbst ist aus zwei Kernen zusammengesetzt, die in dissoziiertem Zustand die Möglichkeit zur freien Rotation haben.

Die kompakte Konformation kommt hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen zustande, das Enzym besitzt keine Disulfidbrücken (Braunstein, 1973). Der isoelektrische Punkt des Enzyms liegt, was auch mit dem Überwiegen der Aminodicarbonsäuren im Molekül über die dibasischen Aminosäuren erwarten läßt, unter pH 5,0. Das pH-Optimum beträgt pH 8,0–8,5 (Rauen, 1964; Bergmeyer, 1962, Jenkins et al., 1959). Der Reibungsquotient (f/fo) beträgt 1,4 und das Achsenverhältnis (a/b) ist 1:4,6, was einer abgeflachten Ellipse entspricht (Jenkins et al., 1959). Das partielle spezifische Volumen $\bar{V}$ beträgt 0,745. Interessant ist die ungleiche Verteilung der Prolinreste, die in der N-terminalen Hälfte konzentriert sind und der Methioninreste (konzentriert in der C-terminalen Hälfte). Es ist kein Prolin in der Nachbarschaft des spezifischen Lysins, das mit dem Coenzym bindet (Kagamiyama et al., 1977). Wahrscheinlich sind keine Disulfidbrücken zwischen beiden Untereinheiten (Bertland and Kaplan, 1968).

Die Inaktivierung des Enzyms geschieht entweder durch Denaturierung des Proteins oder durch Dissoziation der prosthetischen Gruppe. Die spektralen Maxima bei 362mμ und 430mμ werden dahingehend interpretiert, daß Pyridoxalphosphat nicht nur durch das Phosphat an das Enzym gebunden wird, sondern auch durch eine aldehydische Schiff'sche Base mit einer Aminogruppe an dem Enzym. Eine Teilnahme der Aldehydgruppe bei der Bindung an das Apoenzym erklärt die relative Stabilität des Pyridoxalenzyms (Jenkins et al., 1959). Beim Binden des Coenzyms findet eine Konformationsänderung im Apoenzym statt (Fasella and Hammes, 1964, 1965). Dadurch wird dieses gegen Hitzedenaturierung, Harnstoff und extreme pH-Werte geschützt (Bertland and Kaplan, 1968). Bei saurem (pH 2) und alkalischen (pH 11,2) Milieu dissoziiert GOT in seine Untereinheiten (Polyanovskii et al.,1970).

Die Beständigkeit der GOT-Aktivität in Seren ist gut untersucht. Bei tiefer Temperatur (-10°C bis -20°C) ist der Aktivitätsabfall in 14 Tagen nicht höher als 10-15%, wobei anfangs der größte Abfall eintritt (-20°C: nach 24 Stunden 5%, nach 48 Stunden 8% Verlust. Rascher dagegen verliert das Serum seine Aktivität bei 0-4°C (nach 24 Stunden 15%, nach 48

Stunden 25% Verlust) und nimmt bei Raumtemperatur in 24 Stunden um 10–22% seiner Aktivität ab (Südhof und Wötzel, 1960; Taylor, 1961). Es werden in der Literatur jedoch auch andere Werte festgestellt. Bei Erhitzen von Serum auf 100° C, 10 min. lang, entsteht 10% Aktivitätsabfall; das Enzym ist bei 56°C 25 min. lang stabil (Karmen et al., 1955), während Erhitzen bei 75°C, 20 min. lang, Aktivitätsverlust auftritt (Nisselbaum and Bodanski, 1966).

Ebeling et al. (1970) setzte kristallines GOT gepooltem Humanserum zu und lagerte Proben ohne Aktivitätsverlust bis zu 8 Monaten. Karmen et al. (1955) berichteten über Stabilität von 2 - 3 Wochen im Kühlschrank und von 3 - 14 Tagen bei Zimmertemperatur.

Hoffmeister und Junge (1970) stellten ebenfalls im Gegensatz zu Südhof und Wötzel (1960) erst nach 3 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur Aktivitätsabweichungen fest. Aminotransferasen in Kontrollseren, bei denen tierisches Enzym zugesetzt ist, haben unterschiedliche Eigenschaften als diejenigen in menschlichem Serum (Jung et al., 1977). Durch Trypsin und Chymotrypsin wird das Enzym abgebaut und verliert seine biologische Aktivität, ebenso nach Bestrahlung mit UV-Licht und Behandlung mit Ultraschall (Hoppe-Seyler und Thierfelder, 1966).

Polyanovskii et al. (1970) berichten jedoch, daß GOT extrem langsam durch Proteasen angegriffen wird. Braunstein (1973) berichtet über große Stabilität des intakten Enzyms gegenüber Proteasen, Denaturantien und Wärme.

2.2. Glutamat-Pyruvat-Transaminase

GPT katalysiert die Reaktion

Alanin + α - Ketoglutarat $\rightleftharpoons$ Glutamat + Pyruvat

(Barman, 1969). GPT besitzt lange nicht die große Verbreitung wie GOT. GPT läßt sich leichter als GOT aus Schweineherzmuskel isolieren. Bereits 1945 konnten Green et al. ein sehr reines Präparat isolieren. Das Molekulargewicht liegt bei 115 000 (Saier and Jenkins, 1967). Die Aktivität der GPT ist maximal bei pH 7,3 - 7,8 (pH-Optimum) (Bergmeyer, 1962). Die für menschliches Serum optimalen Bedingungen gelten nicht unbedingt auch für Seren anderer Individuen und Organe. Sie können erheblich verschoben sein.

GPT benötigt als Coenzym Pyridoxalphosphat. Dieses ist im Gegensatz zu GOT sehr fest an das Enzymprotein gebunden (Grein und Pfleiderer, 1958).

Das Enzym existiert in zwei spektrophotometrisch verschiedenen Formen,- der Pyridoxalform (λmax = 413mu)

und der Pyridoxaminform (λ max = 325mu). Die Pyridoxaminform ist eine Schiff'sche Base, gebildet durch Kondensation einer Aldehydgruppe des Pyridoxalphosphats mit einer Aminogruppe des Proteins (Torchinskii, 1961). Das Maximum bei 413mμ spricht für eine Azomethin-Bindung des Coenzyms an das Enzymprotein (Hoppe-Seyler und Thierfelder, 1966). SH-Gruppen sind nicht nur im aktiven Zentrum der GPT wirksam, sondern auch an der Bindung des Coenzyms beteiligt. Das Enzym besitzt ca. 5 SH-Gruppen/Mol. (Grein und Pfleiderer, 1958).

Bei der Dialyse gegen 0.002 M NH_4^+ bei 0°C wird GPT innerhalb von 3 Tagen total inaktiviert, während die Inaktivierung bei GOT viel langsamer vor sich geht und erst nach ca. 12 Tagen vollständig ist (Green et al.,1945).

Die Stabilität des Enzyms fällt mit steigendem Reinheitsgrad. Es kann mit Thiol stabilisiert werden (Torchinskii, 1961). Die Stabilitätsdaten in der Literatur sind sehr widersprüchlich. Die GPT-Aktivität im Serum zeigt nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden bei Raumtemperatur einen Verlust von 15 bzw. 20%, bei 4° C 11 bzw. 20% und bei -20°C 10 bzw. 14% (Südhof und Wötzel, 1960). Karmen et al. (1955) berichten über viertägige Stabilität der Probe bei

Zimmertemperatur und im Kühlschrank bis zu zwei Wochen, sie können auch keine Aktivitätsänderung durch Frieren oder Gefriertrocknen feststellen. Mosley and Goodwin (1965) berichten über Aktivitätsverluste nach einer Woche von 15% bei Raumtemperatur, 5% im Kühlschrank und 19% gefroren, obwohl Proben 99 Tage lang bei -40°C oder -50°C aufbewahrt werden konnten. Wilkinson (1962) berichtet über Verluste im gefrorenen Zustand, während Ebeling et al. (1970) einen Serumpool mit kristalliner GPT bei -20°C 3 Monate ohne Verluste aufbewahren konnten.

2.3. Lactatdehydrogenase

LDH gehört zu den Oxidoreductasen. Das Enzym katalysiert den letzten Schritt bei der anaeroben Glykolyse in milchsäureproduzierenden Organismen. Die Funktion von LDH ist die Regulation des Pyruvat-Lactat-Gleichgewichts. Unter anaeroben Bedingungen entwickelt sich Lactat, und unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat für die Respiration benötigt. Die erste gereinigte Enzymprobe wurde von Straub (1940) publiziert. Die katalysierte Reaktion ist

L-Lactat + NAD^+ $\rightleftharpoons$ Pyruvat + NADH + H^+ (Barmann, 1969).

Das Molekulargewicht des Enzyms beträgt 142 000 (Holbrook et al., 1975). Das Molekulargewicht ist unabhängig von der Spezies und gleich für H- und M-Untereinheiten (Brock and Mayo, 1972). Man kann deshalb bei den verschiedenen LDH's gleiche Gestalt annehmen (Fondy and Kaplan, 1965). Das Molekül ist ein Tetramer mit 4 Untereinheiten zu je ca. 35 000 Molekulargewicht, die aus jeweils einer einzigen Polypeptidkette bestehen. Es ist anzunehmen, daß hydrophobe Kräfte die Untereinheiten zusammenhalten (Tirrell and Middleman, 1978). Es gibt zwei verschiedene Polypeptidketten, deren Verteilung davon abhängt, ob das Molekül aus aerobem Gewebe wie im Herzen, (wo H4-Isoenzym vorherrscht) oder anaerobem Gewebe wie im Muskel, (wo M4-Isoenzym vorherrscht), isoliert wurde (Pfleiderer and Wachsmuth, 1961).

Die Untereinheit ist fast globulär; sie entspricht einer Kugel mit Radius 48Å (Tirrell and Middleman, 1978) mit Ausnahme eines Schwanzes mit 20 Aminosäuren am N-terminalen Ende, der im Kontakt mit anderen Untereinheiten des Moleküls ist (Adams et al., 1970). Das aminoterminale Ende ist acetyliert. Bei LDH aus Schweineherz besitzen 32% der Aminosäurekette α-Helixkonformation, bei LDH aus Schweinemuskel 40 % (Holbrook et al., 1975).

Ein beträchtlicher Anteil von 20-25% hat β-Struktur (Holbrook et al., 1975; Rossmann et al., 1967).

Jede Untereinheit enthält eine SH-Gruppe, die für die enzymatische Aktivität essentiell ist. Behandlung von LDH mit Sulfhydrylreagenzien führt nämlich mit der Zeit zum irreversiblen, totalen Aktivitätsverlust (Holbrook et al., 1967). LDH enthält keine Disulfidbrücken (Di Sabato et al., 1963).

Vom LDH aus Schweineherz ist die Sequenz der Aminosäuren im aktiven Zentrum bekannt:
Val - Ile - Gly - Ser - Gly - Cys - Asn - Leu - Asp - Ser - Ala - Arg (Holbrook et al., 1975). His und Tyr sind ebenfalls am aktiven Zentrum beteiligt. (Holbrook and Jeckel, 1968). Tyrosin ist an der Coenzymbindungsstelle (Di Sabato, 1965). Das Enzym aus Schweinemuskel (LDH_5) enthält ein Sulfhydrylpeptid mit der gleichen Aminosäurenanalyse wie das essentielle SH-Peptid von Isoenzym 1 (Holbrook et al., 1966). Die Erklärung für die großen physikochemischen Unterschiede muß anderswo im Molekül gesucht werden. Die zwei LDH-Typen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht . Signifikante Differenzen existieren in ihrer Aminosäurenzusammensetzung, helikaler Struktur, Fingerprintmustern und anderen strukturellen und kinetischen Eigenschaften (Pesce et al., 1967).

So wird der Herztyp schon durch niedrige Konzentration des Substrats Brenztraubensäure gehemmt, während bei gleicher Konzentration die Aktivität des Muskeltyps noch ansteigt und erst bei sehr viel höherer Brenztraubensäurekonzentration Hemmung zeigt (Fasold, 1972). Die Herzmuskelenzyme verlieren bei der Dialyse gegen ionenfreies Wasser ihre Aktivität und werden unlöslich, während Skelettmuskelenzyme gegen reines Wasser dialysierbar sind und nach Gefriertrocknung salzfreier Lösung weitgehend aktiv bleiben. Deren Umsatzzahlen liegen höher, dagegen zeigen die Herzmuskelenzyme höhere Affinitäten zum Substrat und zu verschiedenen Hemmstoffen.

Während Herz-LDH (H_4) noch 95% Aktivität nach 5 Min. bei 60°C aufweist, ist bei Muskel-LDH (M_4) keine Aktivität mehr vorhanden. (Brock and Mayo, 1972). Dieses Ergebnis deckt sich in etwa mit der Kältestabilität (Kreutzer and Fennis, 1964). Peptidase aus B.subtilis inaktiviert Muskel-LDH, während LDH aus Herzmuskel bei gleicher Konzentration unbeeinflußt bleibt. Ebenso ist Muskel-LDH sensitiver als Herz-LDH gegenüber pH-Erhöhungen über 7,5 (Vesell and Yielding, 1968). Diese Enzyme sind völlig verschiedene Proteine, obwohl sie die gleiche Reaktion katalysieren. Ihre großen Strukturdifferenzen weisen darauf hin, daß sie nicht nur von

verschiedenen Genen abstammen, sondern daß sie auch von verschiedenen Genen kontrolliert werden. Das LDH - Isoenzymmuster ist organspezifisch; generell läßt sich sagen, daß Herz-LDH häufiger in Geweben mit hauptsächlich aerobem Stoffwechsel ist, während der Muskel-LDH-Typ mehr in anaeroben Geweben vorherrscht (Everse and Kaplan, 1973).

Bei LDH, wie auch bei anderen Dehydrogenasen spielt das reduzierte Coenzym eine Rolle, um die stabilste Tertiärstruktur zu erhalten (Levi and Kaplan, 1971; Chilson et al., 1965a; Corman and Kaplan, 1967). Der isoelektrische Punkt ist bei pH 4,5 (Herzmuskel), das pH-Optimum liegt zwischen pH 7,4 - 8,5, der Reibungsquotient (f/fo) ist 1,04 (Rauen, 1964). Das partielle spezifische Volumen beträgt 0,74 (Holbrook et al., 1975).

Das Enzym enthält 13 SH-Gruppen/Molekül, wovon drei nötig für die enzymatische Aktivität sind (Gruber et al., 1962).

Das M-Polypeptid ist beim gleichen pH-Wert positiver geladen als das H-Polypeptid. So wandert bei der Elektrophorese das H_4-Isoenzym am schnellsten zur Anode (Pickles and Jeffery, 1964). Die tetramere Schweineherz-LDH (H_4) hat eine etwas kompliziertere C2 - Struktur, mit einem ganzen Molekül pro asymmetrische Einheit, als die P 222 Symmetrie von

Schweinemuskel-LDH (M_4), mit einem halben Molekül pro asymmetrische Einheit (Holbrook et al., 1975; Hackert et al., 1973).

Die Aminosäurenzusammensetzung der analysierten Fragmente bei der H-Kette vom Schwein beträgt:

7,3% Lysin, 2,2% Histidin, 2,9% Arginin, 10,8% Asparaginsäure, 4,8% Threonin, 7,6% Serin, 9,8% Glutaminsäure, 3,8% Prolin, 7,6% Glycin, 6,0% Alanin, 1,3% Halbcystein, 11,7% Valin, 2,9% Methionin, 6,6% Isoleucin, 10,8% Leucin, 2,2% Tyrosin und 1,6% Phenylalanin (Wachsmuth et al., 1964; Holbrook et al., 1967).

Die Aminosäurezusammensetzung des Schweinemuskel-Isoenzyms beträgt:

8,0% Lysin, 3,8% Histidin, 3,5% Arginin, 9,9% Asparaginsäure, 3,8% Threonin, 6,4% Serin, 8,3% Glutaminsäure, 4,1% Prolin, 8,0% Glycin, 6,1% Alanin, 1,6% Halbcystein, 11,1% Valin, 2,5% Methionin, 7,3% Isoleucin, 11,1% Leucin, 2,2% Tyrosin und 2,2% Phenylalanin (Wachsmuth et al., 1964; Holbrook et al., 1967).

Die LDH's aus Herzmuskel haben alle am C-terminalen Ende einen zusätzlichen Aminosäurerest (Holbrook et al., 1975). Die katalytische Aktivität

von LDH ist korreliert mit der tetrameren Quartärstruktur. Bei gleichen experimentellen Bedingungen laufen Dissoziationen, Denaturierung und Aktivitätsverlust parallel. Die Anfangs- und Endstadien können beschrieben werden durch das native homogene Tetramer und andererseits durch das inaktive und (teilweise) aufgefaltete Monomer. Dessen Renaturierung führt bei LDH aus Schweineherz (H_4) zu einer Mischung aus aktiven Tetrameren (bis zu 60%) und inaktiven, höheren Aggregaten, deren Polypeptidketten im denaturierten Zustand gehalten werden durch "falsche" Interaktionen zwischen den Ketten (Rudolph et al., 1977).

Über die Stabilität von Serum-LDH existiert viel widersprüchliche Literatur, jedoch ist generell Herz-Typ stabiler als Muskel-Typ (Kaplan, 1964). Die meisten Autoren berichten über Stabilität bei Zimmertemperatur bis zu 10 Tagen (Michie et al., 1969). andere über einen 10%-igen Aktivitätsabfall nach 24 Stunden unter denselben Bedingungen (Amelung et al., 1966). Einige Autoren nehmen an, daß LDH im Kühlschrank bis zu 4 Wochen stabil ist (Michie et al., 1969), andere berichten über Aktivitätsver-

luste (Michie et al., 1969). Daten über Frieren sind ebenso widersprüchlich, über Aktivitätsverluste und über Stabilität bis zu 2 Tagen oder bis zu 4 Wochen wird berichtet (Davies, 1968; Michie et al., 1969). Empfohlen wird Schnellfrieren durch acetongetrocknetes Eis (Boyd, 1961), jedoch beschrieben Chilson et al.(1965b) bei Schnellfrieren und schnellem Tauen (durch Schütteln unter Leitungswasser) einen 10%-igen Aktivitätsverlust, langsames Tauen (20 - 30 Min. bei Raumtemperatur) ergibt 40% Aktivitätsverlust, langsames Frieren und langsames Tauen 70% Aktivitätsverlust. Eine mögliche Erklärung einiger Daten gibt die Arbeit von Hoffmeister und Junge (1970), die eine minimale Stabilität von LDH bei $0^{o}C$ beschreibt. Bei Temperaturen über oder unter $0^{o}C$ ist die Stabilität größer. Deswegen sollten Proben entweder bei Zimmertemperatur aufbewahrt oder mit sehr tiefen Temperaturen gefroren werden.

Zu ähnlichen Daten kommen Amelung et al. (1966), die über größere Stabilität von LDH bei $20^{o}C$ als bei $4^{o}C$ oder $-8^{o}C$ berichten.

Die einzelnen Serumproben variieren beträchtlich im Aktivitätsverlust während der Lagerung (Latner

and Skillen, 1968). LDH nicht humanen Ursprungs ist stabiler als LDH aus Humanserum (Hoffmeister und Junge, 1970).

LDH ist empfindlich gegen Druckdeaktivierung bei Drucken unterhalb denen, die von Chymotrypsin und Trypsin toleriert werden. Drucke über 15 000 psi deaktivieren LDH, während unter denselben Versuchsbedingungen GOT erst über 20 000 psi deaktiviert wurde. (Carter et al., 1971) In Abwesenheit von Substrat und Coenzym ist die Labilität gegenüber Druck verstärkt. Die pH-Abhängigkeit des Effekts und seine Inhibierung durch SH-Gruppen schützende Agentien sind ein Beweis für die Oxydation von SH-Gruppen als Deaktivierungsmechanismus. Die Oxydation der SH-Gruppen ist mit einer Strukturänderung des Enzyms verbunden. Durch die Auffaltung werden vorher im Inneren gelegene SH-Gruppen exponiert und dadurch oxydierbar (Schmid et al., 1978).

Protein schützt LDH-Isoenzyme (Kreutzer and Eggels, 1965). Im Serum ist LDH wenigstens eine Woche stabil bei Temperaturen bis zu 37°C. In verdünntem Serum ist LDH bei 37° nicht länger als einen Tag stabil (Lazaroni et al., 1958). Dies deutet darauf hin, daß Bestandteile des Serums das Enzym schützen, was auch meine Ergebnisse bestätigt.

Wüst et al. (1965) berichten, daß Albumine den größten stabilisierenden Effekt aufweisen. NADH und Oxalacetat schützen Muskel-LDH vor Hitzedenaturierung und auch vor Proteasenabbau (Vesell and Yielding, 1968). Die Hitzestabilität in vitro könnte mit der Enzymstabilität in vivo korreliert sein. (Vesell and Yielding, 1968).

2.4. Creatinkinase

CK gehört zu den Transferasen bzw. Kinasen, die Phosphatgruppen übertragen und für Energietransfer und ATP-Regeneration sehr wichtig sind. Das Enzym macht 10-20% der löslichen sarkoplasmatischen Proteine des Muskels aus und wurde auch erstmalig aus Kaninchenskelettmuskel isoliert (Kuby et al., 1954 a).

Das Enzym katalysiert die Reaktion Creatin + ATP $\rightleftharpoons$ Creatinphosphat + ADP (Barmann, 1969). Das Molekulargewicht des Enzyms aus Kaninchenmuskel beträgt 82 700 (Yue et al., 1967). CK besteht aus zwei identischen frei dissoziierbaren Untereinheiten von zigarrenförmiger Gestalt, wovon jede aus einer einzigen Polypeptidkette mit je einer carboxylterminalen Lysingruppe besteht. Zwischen beiden Untereinheiten

bestehen keine kovalenten Bindungen, auch keine Disulfidbrücken. Sie liegen Seite an Seite. Die kompakte, engmaschige Struktur des nativen Enzymmoleküls (Reibungsqotient $f/f_o = 1.21$) wird wahrscheinlich durch hydrophobe Kräfte und überlagerte Wasserstoffbrücken zwischen den Ketten zusammengehalten. Das relativ niedrige Reibungsquotientverhältnis entspricht einem nicht hydrierten Ellipsoid mit einem Achsenverhältnis 5:1. Die Untereinheiten haben den gleichen Reibungsquotienten und das gleiche Achsenverhältnis wie das native Molekül. Das partielle spezifische Volumen beträgt 0,735 (Yue et al.,1967). CK könnte ein zylindrisches Molekül mit einer hervorragenden C-terminalen Kette sein (Thompson et al., 1964).

Das Enzym ist relativ resistent gegenüber Harnstoff, Mercaptoäthanol und tryptischer Verdauung, was ebenso für eine Molekülstruktur spricht, die mit unüblicher Stärke und hohem Ordnungsgrad zusammengehalten wird (Yue et al.,1967). Die üblichen Parameter von ORD-Studien weisen auf eine kompakte globuläre Struktur mit 25 - 30 % α-Helixanteil und weniger als 15% β-Struktur hin. Die Resistenz des nativen Proteins gegenüber tryptischer Verdauung (4% der Rate) nach Denaturierung (Lui and Cunningham, 1966), deutet ebenfalls auf eine kompakte

Struktur hin. Der isoelektrische Punkt ist bei pH 6,0 - 6,1 (Noda, 1954), das pH-Optimum bei pH 9 (Bergmeyer, 1962). Das Enzym hat einen ziemlich breiten Stabilitätsbereich im pH 6,5 - 9,5 (Kuby et al., 1954b).

Creatinkinase aus Kaninchenmuskel enthält: 9,0% Lysin, 4,6% Histidin, 4,7% Arginin, 11,6% Asparaginsäure, 4,8% Threonin, 5,7% Serin, 10,4% Glutaminsäure, 5,0% Prolin, 8,7% Glycin, 3,5% Alanin, 1,1% Halbcystein, 7,3% Valin, 2,6% Methionin, 3,5% Isoleucin, 9,7% Leucin, 2,6% Tyrosin, 4,2% Phenylalanin, 1,0% Tryptophan (Yue et al., 1967). Das aktive Zentrum enthält eine Stickstoffgruppe, die Mg^{2+} als Cofaktor benötigt, und zwei Sulfhydrylgruppen, die ebenso für die Funktion des Enzyms wichtig sind (Kuby and Noltmann, 1962). Die Sequenz um beide reaktive SH-Gruppen ist Val - Leu - Thr - CySH - Pro - Ser - Asp NH_2 - Leu (aktives Zentrum). Da Prolin dem Cystein benachbart ist, liegt dieser Teil nicht als α-Helix vor (Mahowald, 1965). Die Creatinbindungsstelle ist ein enger Schlitz in der Oberfläche des Enzyms.

Die einzelne Cysteingruppe pro Untereinheit, die im katalytischen Zentrum liegt, spielt eine wichtige Rolle. Die Thiolgruppe ist in einem teilweise ionisierten Zustand, der sich nicht signifikant ändert

über dem ganzen pH-Bereich, in dem das Enzym strukturell stabil ist (Watts and Rabin, 1962). Das essentielle Thiol stabilisiert die Tertiärstruktur des Enzyms (Watts, 1966). Die pH-unabhängige Reaktivität des Thiols wurde erklärt durch eine spezifische Hydrogenbindung zu einem nahegelegenen Histidin (Pradel and Kassab, 1968). Die Lokalisation des Thiols in einem hydrophoben Bereich unterstützt diesen Prozeß, da eine Hydrogenbindung, die eine Thiolgruppe einschließt, vermutlich sehr schwach ist (Watts, 1973). Die Creatinkinase enthält 6 freie SH-Gruppen pro Mol,von denen 4 schlecht zugänglich und 2 exponiert sind. Letztere sind für die katalytische Funktion des Enzyms erforderlich (Madelian and Warren, 1977). Ebenfalls wichtig für die katalytische Aktivität sind zwei Lysingruppen (Kassab et al., 1968) und zwei Histidinreste pro Molekül (Pradel and Kassab, 1968). Auf deren allmählicher Oxydation, wie sie bei längerer Aufbewahrung bei Zimmertemperatur, aber auch bei 4°C und während einer länger dauernden Aktivitätsbestimmung auftritt, beruht die Inaktivierung des Enzyms. Diese Tatsache ist der Hauptgrund dafür, daß bereits geringfügige Unachtsamkeiten bei der Abnahme und Bestimmung starke Auswirkungen auf die Ergebnisse haben (Häcker et al., 1967). Das erklärt auch die

unterschiedlichen Daten betreffs Stabilität. Diese Widersprüche könnten auch durch unterschiedliche Methoden bedingt sein (Demetriou et al., 1974). So sind z.B. die von außen dem Serum zugesetzten Enzyme stabiler als das endogene Enzym (Rollo et al., 1978). Im Kaninchenmuskel sind alle drei Isoenzyme von CK vorhanden, wobei der Muskeltyp mit 70 - 95% dominiert. Da das Muskelisoenzym engmaschiger gestrickt ist als das Gehirnisoenzym (Yue et al., 1967) und dadurch stabiler ist (Keutel et al., 1972), könnten auch Schwankungen in der Isoenzymzusammensetzung die Ergebnisse verfälschen. Das reduzierte Glutathion, das auch in dieser Arbeit im Boehringer Testpack zur Stabilisierung des Enzyms zur Verwendung gelangt, ist auch eine sehr labile Substanz und kann die Reproduzierbarkeit verschlechtern (Rotthauwe and Cerqueiro, 1963; Sandifort, 1977).

Die Verwendung von SH-Donatoren zeigt, daß es sich hier zum großen Teil nur um reversible Aktivitätsverluste handelt, die ihre Ursache in der Oxydation der funktionellen SH-Gruppen des Enzyms haben. Erst nach längerer Zeit treten irreversible Inaktivierungen auf (Häcker et al., 1967).

Vergleicht man CK mit der Stabilität anderer Serumenzyme, so ergibt sich eindeutig, daß die Serum-CK das instabilste aller diagnostisch wichtigen

Serumenzyme ist. Im Gegensatz zu der relativ geringen Alterung bzw. Aktivitätsabnahme bei den Transaminasen und der LDH bei Aufbewahrung von Serum im Kühlschrank bei 4°C, die durchschnittlich innerhalb von drei Tagen ca. 10% beträgt (Feissli et al., 1966,, nimmt unter denselben Bedingungen die CK-Aktivität des Serums rasch ab.

CK zeigt bemerkensverte Stabilität bei längerer Dialyse gegen Glycin-Puffer pH 9,0 niedriger Ionenstärke. Bei Lagerung als 3-5prozentige sterile Lösung bei 0°-4°C über eine sechsmonatige Periode nimmt die Aktivität eher noch zu als Ergebnis der Präzipitation weniger stabiler Verunreinigungen oder der Reaktivierung von teilweise denaturiertem Enzym. Das gefriergetrocknete Puder, bei -18°C gelagert, verliert selbst bei häufigem Aufwärmen und Wiedereinfrieren nur einen geringen Teil seiner Aktivität. Auch kristalline Suspensionen in Alkohol sind bei -12°C stabil (Yue et al., 1967). Das Enzym ist instabil über 50°C, aber ziemlich stabil bei 37°C (zwischen pH 6,5 und 9,5). Wenn jedoch das Stabilitätslimit erreicht ist, ist die Denaturierung schnell und irreversibel (Watts, 1973). Rotthauwe und Cerqueiro (1963) stellten bei Patientenserum von an progressiver Muskeldystrophie Erkrankten 6 % Aktivitätsverlust nach einem Tag bei -16°C, bis zu

47% Verlust bei 4°C und 74% bei 20°C. Michie et al. (1969) fanden 90% Aktivitätsverlust nach 48 Stunden Aufbewahrung im Kühlschrank. Nach Rosalki (1967) ist Serum bei Raumtemperatur 48 Stunden stabil, bei 4°C sieben Tage lang und bei -18°C mindestens einen Monat. Dabei ist die Enzymausbeute während Lagerung bei verschiedenen Temperaturen in Serum wesentlich größer als in wässrigem Puffer (Nealon and Henderson, 1977), was meine Ergebnisse bestätigt. Es besteht die Möglichkeit, daß die Steigerung der CK-Stabilität im Serum durch chelierende Agentien herrühren könnte, die die kationabhängigen Proteasen inhibieren (Rollo et al., 1978). Die Aktivitätsbestimmungen sind unabhängig von der Aktivitätshöhe (Kim et al., 1978).

1% Albumin wirkt als Puffer gegen Denaturierung durch lokale pH-Fluktuationen (Milner-White and Watts, 1971). CK wird vom blauen Anteil des Tageslichts, auch in gefrorenem Zustand irreversibel bis zu 25% inaktiviert. Diese Verluste rühren von molekularen Veränderungen der Enzymstruktur durch absorbierte Energie von sichtbarer Strahlung her. Die Proben sollten daher im Dunkeln gelagert und der Versuch in gedämpftem Licht durchgeführt werden (Thompson, 1969). Chlorid und Sulfat inhibieren CK, ebenfalls Spuren von Zn, Mn und Cu. Es sollte nur sauberes Glas und

deionisiertes, in Glas destilliertes Wasser verwendet werden (Conn and Anido, 1966).

Biologische Halbwertszeiten oder Zerfallkonstanten für CK in vitro decken sich mit den Werten von 37°C in vivo. Die Aktivitätsverluste von CK in vivo sind daher hauptsächlich thermisch und nicht physiologisch durch die Blutströmung bedingt (Morin, 1977).

CK hat zwei Inaktivierungstypen: eine initiale, schnelle Inaktivierung, die mit Thiolen reversibel ist (wahrscheinlich oxydative Inaktivierung) und eine stufenweise Inaktivierung, die nicht reversibel ist und temperaturabhängig ist (Morin, 1977). Bei Hitzeinaktivierung (56°C) ist in den ersten 5 Minuten ein 10-facher Abfall, anschließend erfolgt ein linearer Abfall der Inaktivierungskurve (Thompson, 1969).

In dieser Arbeit erfolgt der schnelle Aktivitätsabfall bis zu einer Minute Schüttelzeit und anschließend die langsame Inaktivierung.

2.5. Alkalische Phosphatase

AP gehört zu den Hydrolasen und dient zur Spaltung von Monophosphatesterverbindungen. Das Enzym katalysiert die Reaktion

Orthophosphatmonoester + $H_2O \rightleftharpoons$ Alkohol + anorg. Phosphat (Barman, 1969)

Das Molekulargewicht des Enzyms aus Kälberdarm beträgt 100 000 (Engström, 1961).

Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,7 (Fernley, 1971). Für das pH-Optimum werden Werte von pH 8,0 (Rauen, 1964) und ca. pH 9,6 (Bergmeyer, 1962) angegeben.

Alkalische Phosphatase ist ein Dimer aus zwei sehr ähnlichen oder gleichen Untereinheiten. Das Enzym besitzt ein spezifisches Volumen von 0,756 und ist ein Metalloenzym mit 4g - Atom Zink/Mol (Fosset et al., 1974). Der Zinkgehalt ist wesentlich für die Aktivität, die Zn-Atome erhalten die natürliche Konformation unter Stressbedingungen (Trotman and Greenwood, 1969). Im nativen Enzym ist keine SH-Gruppe für Jodessigsäure oder Ellmans Reagenz zugänglich, wohingegen das denaturierte Enzym zwei freie Sulfhydrylgruppen pro Dimer zeigt. Der Gehalt von Halbcystein weist auf 4 Disulfidbrücken pro Mol Protein hin (Fosset et al., 1974). Die alkalische Phosphatase ist ein Glycoprotein (Engström, 1961), der Kohlenhydratanteil beträgt 12%. AP aus Kälberdarm enthält: 4,7% Lysin, 2,8% Histidin, 9,1% Arginin, 11,3% Asparaginsäure, 6,7% Threonin, 4,2% Serin, 9,2% Glutaminsäure,

5,4% Prolin, 8,0% Glycin, 10,6% Alanin, 0,9% Halbcystein, 7,8% Valin, 2,2% Methionin, 2,6% Isoleucin, 6,5% Leucin, 3,7% Tyrosin, 2,7% Phenylalanin, 1,2% Tryptophan (Fosset et al., 1974). Die Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum ist Asp-Ser-Ala (Engström, 1964).

Die gereinigte Kälberdarm-AP erhält sich bei voller Aktivität mindestens zwei Monate bei pH 8, 4°C, Protein-Konzentration 1 mg/ml in 0,1 M Tris-Puffer mit 0,1 M NaCl. Sie wird bei saurem pH schnell inaktiviert, ebenfalls beim Gefriertrocknen. In Gegenwart von SDS ist Säuger-AP ungewöhnlich stabil (Mather and Keenam, 1974), bei Dialyse gegen EDTA wird AP aus Kälberdarm inaktiv (Hofstee, 1955). Die Stabilität der alkalischen Phosphatase ist stark spezies- und organspezifisch. So ist zum Beispiel menschliche Placenta-AP gegenüber andern bemerkenswert stabil gegen Hitze und Schüttelbehandlung. Es war bei Erhitzen des Enzyms in einem Wasserbad bei 79°C unter Schütteln nach 40 min. immer noch Aktivität vorhanden (Thomas and Harris, 1971). Die nicht menschlichen Placenta-AP denaturieren schon viel früher (Posen et al.,1968, 1969).

AP war in 0,9% NaCl nach GOT das zweitstabilste Enzym. Dies steht im Einklang mit der Literatur, wonach Glycoproteine häufig erhöhte Stabilität gegen-

über Proteolyse, Hitze, Lagerung oder Denaturantien haben, die in vielen Fällen dem Kohlenhydratanteil zugeschrieben werden muß (Pazur and Aronson, 1972; Pazur et al., 1970; Christensen et al., 1976). In diesem Zusammenhang ist auch die Stabilität der AP gegenüber hydrostatischem Druck (Penniston, 1971) zu erwähnen.

2.6. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

G6P-DH gehört zu den Oxydoreduktasen, die Wasserstoff von dem einen auf ein anderes Substrat übertragen. Als Coenzym fungiert NADP. G6P-DH ist das Schlüsselenzym des Pentosephosphatzyklus. Das Enzym wurde in Erythrozyten ("Zwischenferment") durch Warburg und Christian entdeckt und aus Unterhefe angereichert (Warburg und Christian, 1931, 1932).

Es katalysiert die Reaktion

Glucose-6-Phosphat + NADP $\rightleftharpoons$ Gluconat-6-Phosphat + NADPH+H^+

(Barman, 1969).

Das Molekulargewicht des Enzyms beträgt 128 000 (Andrews, 1965) oder 102 000 für das NADP-freie Enzym (Yue et al., 1967). Der isoelektrische Punkt ist bei pH 4,8 (Negelein und Gerischer, 1936) und für das NADP-freie Enzym bei pH 6,05 (Yue et al., 1967).

Für das pH-Optimum werden Werte von pH 8,3 (Bermeyer, 1962) bis pH 9,2 (Dogmagk et al., 1969) angegeben.

G6P-DH enthält: 9,0% Lysin, 1,2% Histidin, 3,6% Arginin, 13,6% Asparaginsäure, 4,5% Threonin, 6,8% Serin, 10,8% Glutaminsäure, 5,0% Prolin, 8,4% Glycin, 6,8% Alanin, 1,4% Cystein, 5,8% Valin, 1,5% Methionin, 4,8% Isoleucin, 8,2% Leucin, 3,2% Tyrosin, 4,3% Phenylalanin und 1,0% Tryptophan.

Das Enzym enthält 8 SH-Gruppen pro Molekül. 2 SH-Gruppen sind an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert, jedoch für die katalytische Funktion irrelevant, 4 im Enzyminnern verborgen und 2 sind über Disulfidbrücken verbunden. Für die katalytische Funktion weiter wichtig sind Lysin-, Histidin- und Tyrosingruppen (Domschke et al., 1970).

G6P-DH wird durch Natriumionen in geringer Konzentration aktiviert (Hoppe-Seyler und Thierfelder, 1964). Denaturiertes Enzym wird reaktiviert durch Enzymrohextrakt oder kristallisiertes Ochsenserumalbumin (Kirkman and Hendrickson, 1962). Obwohl Albumin G6P-DH aus Hefe schützt, benötigt das aktive menschliche Erythrozytenenzym Albumin nicht zur Stabilität, wenn NADP anwesend ist (Noltmann et al., 1961). G6P-DH ist ein Dimer, kann aber leicht Aggregate formen von weniger Aktivität in der Abwesenheit von SH-

Reagenzien (Reithel, 1963).

Bei der Aufarbeitung wurden große Aktivitätsverluste festgestellt (Glaser and Brown, 1955; Julian et al., 1961). G6P-DH aus Erythrozyten ist bei siebenminütiger Erwärmung stabil bis 57°C und wird dann abrupt inaktiviert. Die Transitionstemperatur liegt bei 59°C (Luzzatto and Allan, 1965). Dieses scharfe Inaktivierungsprofil erinnert an den co-operativen Zusammenbruch einer hochstabilisierten Struktur, wie z.B. an eine Helix - random coil Transition (Sheraga, 1963). Das Coenzym TPN = NADP erhöht die Thermostabilität (Marks et al., 1961).

2.7. Adenylatkinase

AK gehört wie CK zu den Transferasen bzw. Kinasen und hat wahrscheinlich den gleichen Reaktionsmechanismus der Mg-ATP-Übertragung und -Bindung und andere Analogien (Noda, 1973), wie zum Beispiel His-Cys im aktiven Zentrum (Watts and Rabin, 1962).

Das Enzym wurde erstmalig von Colowick und Kalckar (1943) aus Kaninchenmuskel isoliert und katalysiert die Reaktion ATP + AMP ADP + ADP (Barman, 1969).

Das Molekulargewicht des Enzyms aus Schweinemuskel beträgt 21 300 (Noda, 1973). Es ist aus 191 Aminosäuren zusammengesetzt. Zwei SH-Gruppen, die schnell oxydierbar sind, haben Bedeutung zur Bewahrung der "aktiven" Konformation, scheinen aber nicht selbst an der Substratbindung beteiligt zu sein, wobei die Imidazolgruppe eines Histidins eine Rolle spielt (Noda, 1973). AK enthält: 10,8% Lysin, 1% Histidin, 5,7% Arginin, 5,7% Asparaginsäure, 1% Asparagin, 7,2% Threonin, 5,7% Serin, 9,8% Glutaminsäure, 3,1% Prolin, 9,8% Glycin, 4,1% Alanin, 8,8% Valin, 3,1% Methionin, 4,6% Isoleucin, 9,3% Leucin, 3,6% Tyrosin, 0% Tryptophan, 2,6% Phenylalanin, 3,1% Glutamin (Heil et al., 1974). Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei pH 7,5 (Bergmeyer, 1962), der Reibungsquotient (f/fo) ist 1,15, das partielle spezifische Volumen ist 0,73 (Rauen, 1964) und der isoelektrische Punkt ist bei pH 6,1 (Noda and Kuby, 1957).

Schulz et al. (1974) klärten die dreidimensionale Struktur des AK-Kristalls auf. Das kugelförmige Protein wird durch eine tiefe Spalte in zwei Hälften geteilt. In dieser Region ist His-36 gelegen und stellt das aktive Zentrum dar. Colowick und Kalckar (1943) beschreiben die aus Kaninchenmuskel gewonnene Adenylatkinase als ein außerordentlich temperaturbeständiges

Enzym, denn es behält noch nach 30 Min. langem Aufbewahren bei 100°C in 0,1M HCl seine Wirksamkeit. In anderen Geweben ist die AK allerdings weniger hitzestabil als im Muskel (Todd and Baron, 1965). Wie Bargoni (1958) zeigen konnte, beruht die scheinbar ungewöhnliche Wärmebeständigkeit der Adenylatkinase auf der Schutzwirkung durch Bestandteile des Muskelgewebeextrakts während der Zubereitung des Enzyms. Ferner stellte Bargoni (1958) die Hemmung der Inaktivierung nach Zusatz von Albumin, NaCl, Mg^{2+} oder Adenosin-5-phosphat fest. Während das Adenylatkinase-Präparat bei 50°C während 5 Minuten vollkommen inaktiviert wird, verliert es nur 50% seiner Wirksamkeit, wenn die Lösung 0,1M NaCl enthält; in diesem Falle wird die vollständige Inaktivierung nach 5 Minuten erst bei 70°C erreicht. Auch Rapley (1968) konnte zeigen, daß 0,05M NaCl stabilisierenden Effekt auf die AK hat und die Aggregation der AK-Moleküle von der NaCl-Konzentration abhängt. Albumin hemmt die Inaktivierung bei Temperaturen bis zu 50°C fast vollständig (Bargoni, 1958). 1% Albuminzusatz schützt gegen Denaturierung durch Verdünnung, nicht aber gegen Hitzedenaturierung (Bowen and Kerwin, 1956). Die Reinigung der AK reduziert drastisch die Enzymstabilität gegenüber Hitze (Bowen and Kerwin, 1956), wenn die SH-

Gruppen nicht mit thiolschützenden Gruppen versehen sind (Noda, 1962). Die Stabilisierung der AK durch Albumin und Dithiothreitol wurde auch von Brownson und Spencer (1972) festgestellt. Serum stabilisiert die AK (Crasser, 1980), was im Einklang mit den hier gefundenen Ergebnissen steht. Die von Colowick und Kalckar (1943) festgestellte Säurestabilität läßt sich dadurch erklären, daß ungefähr 2/3 aller Aminosäurenreste an der Sekundärstruktur beteiligt sind (Schulz et al., 1974). Im Gegensatz zur rohen Muskel-Myokinase ist die gereinigte jedoch gegenüber Säuren instabil (Hoppe-Seyler und Thierfelder, 1966). AK wird schon bei Berührung mit Glas oxydiert (Colowick and Kalckar, 1943), wobei die Inaktivierung möglicherweise bei Glas schneller als bei Kunststoffröhrchen abläuft (Todd and Baron, 1965). Auch Crasser (1980) stellte äußerste Instabilität der AK fest: Schon nach einer Minute kräftigen Schüttelns von Hand sank die Aktivität der AK bis auf wenige Prozente der Ausgangsaktivität. AK in physiologischer Kochsalzlösung verlor nach zweistündigem ruhigem Stehen im Exsikkator seine Aktivität bis auf 4%.

Diese Instabilität, über die auch in dieser Arbeit berichtet wird, ist auf Grund der geringen Molmasse recht erstaunlich. Zieht man allerdings den

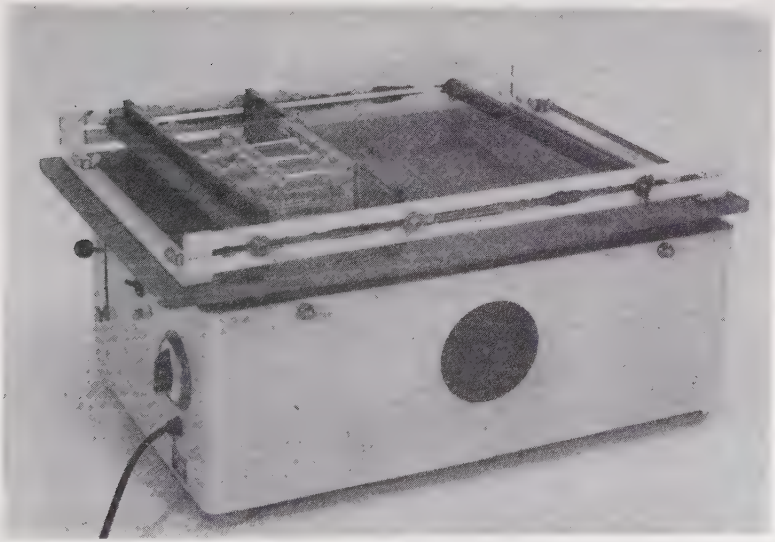
engen Isthmus in Relation zur Gesamtfläche in Erwägung, kann man sich leicht vorstellen, daß bei Einwirkung von Scherkräften das Molekül an der Engstelle auseinanderbricht. Da die wahrscheinlichste Bruchstelle das aktive Zentrum darstellt.dürfte das Molekül dadurch sofort inaktiviert werden.

C. Experimenteller Teil

1. Material und Methoden

1.1. Geräte

- Spektralphotometer (Marke Zeiss)
- Schreiber
- Schüttelgerät



Verwendete Schüttelfrequenz 150/min
bei einer Auslenkung von ± 1,25 cm und
Schüttelzeiten von 0 min, $\frac{1}{2}$ min, 1 min, 2 min.

1.2. Enzyme

1.2.1. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)
aus Schweineherz
L-Aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase
(EC 2.6.1.1)
Suspension in 3,2M Ammoniumsulfatlösung,
pH ca. 6; 2,5mM α-Ketoglutarat; 50mM Maleat
Spezifische Aktivität: ca. 200U/mg
Boehringer Mannheim Nr. 105 546 (15 335)

1.2.2. Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)
aus Schweineherz
L-Alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase
(EC 2.6.1.2)
Suspension in 3,2M Ammoniumsulfatlösung,
pH ca. 6.
Spezifische Aktivität: ca. 80U/mg
Boehringer Mannheim Nr. 105 562 (15 344)

1.2.3. Lactat-Dehydrogenase (LDH)
aus Schweineherz
L-Lactate: NAD oxidoreductase (EC 1.1.1.27)

Kristallsuspension in 3,2M Ammoniumsulfat-
lösung, pH ca. 6.
Spezifische Aktivität: ca. 400U/mg
Boehringer Mannheim Nr. 107 034 (15 372)

Lactat-Dehydrogenase (LDH)
aus Schweinemuskel
L-Lactat: NAD oxidoreductase (EC 1.1.1.27)
Kristallsuspension in 3,2M Ammoniumsulfat-
lösung, pH ca. 6,5.
Spezifische Aktivität: ca. 550U/mg
Boehringer Mannheim Nr. 107 077 (15 373)

1.2.4. Creatin-Kinase (CK)
aus Kaninchenmuskel
ATP: Creatine N-phosphotransferase
(EC 2.7.3.2) Lyophilisat, salzfrei
Spezifische Aktivität: ca. 25U/mg Lyophilisat
Boehringer Mannheim Nr. 126 969 (15 334)

1.2.5. Alkalische Phosphatase (AP)
aus Kälberdarm
Orthophosphoric-monoester phosphohydrolase
(EC 3.1.3.1)
Reinheitsgrad 1
Suspension in 3,2M Ammoniumsulfatlösung, pH
ca. 7; 1mM Magnesiumchlorid; 0,1mM Zinkchlorid.

Spezifische Aktivität: ca. 400U/mg

Boehringer Mannheim Nr. 108 138 (15 436)

1.2.6. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G 6P-DH) aus Hefe

D-Glucose-6-phosphate: NADP 1-oxidoreductase (EC 1.1.1.49)

Reinheitsgrad 1

Suspension in 3,2M Ammoniumsulfatlösung, pH ca. 6.

Spezifische Aktivität: ca. 350 U/mg

Boehringer Mannheim Nr. 127 035 (15 304)

1.2.7.1. Adenylatkinase (AK) ATP:AMP phosphotransferase (EC 2.7.4.3)

aus Schweinemuskel

Suspension in 3,2M Ammoniumsulfatlösung, pH ca. 6.

Spezifische Aktivität $\geq$ 360U/mg

Boehringer Mannheim Nr. 107 506 (15 350)

1.2.7.2. Adenylatkinase(AK) gereinigt, aus Schweinemuskelhomogenat, Dr. H. Schirmer, Heidelberg*; feuchtes, gepacktes Enzym wurde in physiologischer Kochsalzlösung 1:800 verdünnt.

---

* Wir danken für die Überlassung einer hochgereinigten AK-Präparation aus Schweinemuskel.

1.3. Seren

Die Seren entstammten stoffwechselgesunden Patienten und waren aus 10 Versuchspersonen gepoolt, hier kurz als Patientenserum (PS) bezeichnet.

1.4. Aktivitätsbestimmungen

1.4.1. - 1.4.6. Biochemica-Test-Combinationen. Schüttelvorgang wie oben beschrieben

1.4.1. für GOT (optimiert)
UV-Test (Hg 366nm)
Bestimmung der Aktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase im Serum unter substratoptimierten Bedingungen,
Boehringer Mannheim Nr. 15 766

1.4.2. für GPT (optimiert)
UV-Test (Hg 366nm)
Bestimmung der Aktivität der Glutamat-Pyruvat-Transaminase im Serum unter substratoptimierten Bedingungen,
Boehringer Mannheim Nr. 15 767

1.4.3. für LDH
UV-Test (Hg 366nm)
Bestimmung der Aktivität der Lactat-Dehydrogenase im Serum,
Boehringer Mannheim Nr. 15 977

1.4.4. für CK aktiviert

UV-Test (Hg 366nm)

Bestimmung der Aktivität der Creatinkinase im Serum nach Reaktivierung mit SH-Reagenzien, Boehringer Mannheim Nr. 15 926

1.4.5. für Alkalische Phosphatase (optimiert)

Farb-Test (400-420nm, z.B. Hg 405nm

Bestimmung der alkalischen Phosphatase im Serum, Boehringer Mannheim Nr. 15 990

1.4.6. für G6P-DH

UV-Test (Hg 366nm)

Bestimmung der Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase im Serum und Erythrozyten, Boehringer Mannheim Nr. 15 870

1.4.7. für Adenylatkinase (AK)

Eine Methode zur Bestimmung der AK-Aktivität geben Jarovek, Gruber und Bergmeyer (Bergmeyer, 1962).

Prinzip:

(1) $$AMP + ATP \xrightleftharpoons{AK} 2\ ADP$$

(2) $$2\ ADP + 2\ PEP \xrightleftharpoons{PK} 2\ ATP + 2\ Pyruvat$$

(3) $$2\ Pyruvat + 2\ NADH + 2\ H^+ \xrightleftharpoons{LDH} 2Lactat + 2\ NAD^+$$

Die NADH-Abnahme, gemessen an der Extinktionsänderung bei 366nm ist der AMP- und ADP-Menge proportional.

Notwenige Reagenzien:

1) Triäthanolamin-hydrochlorid
2) Kaliumcarbonat, p.a.
3) Magnesiumsulfat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, p.a.
4) Kaliumchlorid, p.a.
5) Phosphoenolpyruvat, PEP als Tricyclohexylammoniumsalz; Boehringer Mannheim 15 308
6) Natriumhydrogencarbonat, $NaHCO_3$, p.a.
7) Reduz. Nikotinamid-adenin-dinucleotid,NADH als Dinatriumsalz NADH-Na_2;
   Boehringer Mannheim 15 142
8) Adenylatkinase, AK, als Myokinase bezeichnet aus Schweinemuskel
   Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung;
   = 360 U/mg (bei 25°C u.A-5-MP und ATP als Substrat) Boehringer Mannheim 15 350,
   10 mg/ 2 ml
   Eigene Messung ergab die mehrfache Aktivität
9) Pyruvatkinase, PK
   aus Kaninchenmuskel
   Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung
   ca. 200 U/mg (25°C)
   Boehringer Mannheim 15 744, 100mg/ 10 ml

10) Lactat-Dehydrogenase, LDH
aus Kaninchenmuskel
Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung
ca. 550 U/mg (25°C)
Boehringer Mannheim 15 371, 25 mg/5ml

11) Adenosin-monophosphat, AMP;
Boehringer Mannheim Nr. 15 015

12) Adenosin-triphosphat, ATP;
Boehringer Mannheim Nr. 15 028

Herstellung der Lösungen

Puffer: 40 g Triäthanolamin-hydrochlorid in Wasser lösen. Mit K_2CO_3-Lösung auf pH 7,45 einstellen und mit Wasser auf 500 ml auffüllen.

PEP: 60 mg PEP, 1110 mg $MgSO_4.7H_2O$ und 1200 mg KCl mit Wasser zu 12 ml lösen.

NADH: 60 mg NADH-Na_2 in 5 ml 5% $NaHCO_3$-Lösung lösen.

PK: Stammsuspension unverdünnt verwenden.

LDH: Stammsuspension unverdünnt verwenden.

AMP: 33,3 mg mit Wasser zu 12 ml lösen.

ATP: 39,9 mg mit Wasser zu 12 ml lösen.

Als Reaktionslösung wird in die Küvette pipettiert:

Puffer	2,5 ml
ATP	0,2 ml
AMP	0,2 ml
PEP	0,2 ml
NADH	0,05 ml
LDH	0,02 ml
PK	0,02 ml

und im Photometer warmgestellt. Die Temperatur der Küvette wurde durch einen Thermostaten geregelt: 25°C .

Die zu untersuchende Enzymprobe, hier Adenylatkinase, wird mit physiologischer Kochsalzlösung 1:100 verdünnt und je 2 ml in 4 Schüttelglasgefäße mit Glasschliffstopfen pipettiert. Diese Lösung wird im Schüttelgerät 0 min, $\frac{1}{2}$ min, 1 min und 2 min geschüttelt. Von jedem Schüttelglas wird 0,1 ml in die Reaktionslösung einpipettiert, vorsichtig umgerührt und sofort die Extinktion im Photometer bei 366 nm gemessen; Glasküvette mit 1 cm Schichtdicke, Meßtemperatur: 25°C. Die Extinktionskurven wurden an ihren linearsten Stellen ausgewertet.

Berechnung:

(Nach Bergmeyer, 1962, Bd.1, S. 334)

$$\text{Vol.-Akt.} = \frac{1000 \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\frac{mU}{ml}\right]$$

V = Testvolumen (Küvetteninhalt) = 3,29 ml

v = Probevolumen im Test = 0,1 ml

ε = 3,3 gemessen bei 366 nm

d = 1 cm Schichtdicke

Da nun durch 1 Mol ATP 2 Mole NADH umgewandelt werden, muß die Gleichung noch mit dem Faktor 1/2 multipliziert werden:

$$\text{Vol.-Akt.} = \frac{500 \cdot V}{\varepsilon \cdot d \quad v} \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\frac{U}{l}\right]$$

$$\text{Vol.-Akt.} = \frac{500 \cdot 3{,}29 \text{ ml}}{3{,}3 \cdot 1 \text{ cm} \cdot 0{,}1 \text{ ml}} \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\frac{U}{l}\right]$$

$$\text{Vol.-Akt.} = 5000 \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\frac{U}{l}\right]$$

1.5. Variationsstatistische Betrachtungen

a) Jede statistische Masse oder statistische Gesamtheit besteht aus unendlich vielen Varianten, die betreffs ihrer Größenmerkmale, Güteklassen, Intensitäten oder Aktivitäten (A_i) eine Häufigkeitsverteilung

bilden mit selten vorkommenden kleinen, häufig erscheinenden mittleren und wieder selten auftretenden großen Varianten.

Jede Stichprobe aus einer statistischen Masse bildet eine endliche statistische Gesamtheit und kann durch Ordnung ihrer Varianten als eine Verteilung

$$\begin{Bmatrix} x_1, & x_2, & \dots & x_i, \dots x_n \\ y_1, & y_2, & \dots & y_i, \dots y_n \end{Bmatrix}$$

mit zu errechnenden statistischen Maßzahlen charakterisiert und dargestellt werden. Handelt es sich um eine Messungsserie von Längen, Gewichten, Zeiten, Temperaturen, Intensitäten, in dieser Arbeit um Aktivitäten, so ist

x_k = kleinste Variante

$x_i = x_g$ = größte Variante

x_i = beliebige Variante der Meßreihe

x_n = letztgezählte Variante.

$\delta = x_i = x_g - x_k$ = Variationsbreite der Meßvarianten.

Dann sind y_i = Häufigkeit des Auftretens der Variante x_i. Es können auch alle $y_i = 1$ sein, wie bei dieser Arbeit. Immer ist die Gesamtzahl der Varianten gleich dem Umfang n der endlichen statistischen Gesamtheit, der Stichprobe:

$n = \sum_{i=1}^{n} y_i = y_1 + y_2 + \dots y_i + \dots y_n$=Umfang der Stichprobe

$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} (x_i \cdot y_i)$ bzw. wenn $y_i = 1$ ist,

$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} x_i = 1/n \cdot S_x$

= Mittelwert der Varianten der Meßreihe

= Mittelwert der Stichproben - Verteilung

S_x = Summe aller Varianten, bzw. aller Meßwerte

S_x^2 = Summe aller quadrierten Varianten.

Weil bei den kleinen Stichprobenumfängen dieser Arbeit keine Häufigkeiten klassifiziert werden, d.h., weil alle

y_i = 1 sind, wird

s = Streuung der Varianten

s^2 = Varianz der Varianten

$s^2 = 1/n \cdot \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2$, besser $s^2 = 1/(n-1) \cdot \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2$

$s^2 = 1/(n-1) \cdot (S_{x2} - \bar{x} \cdot S_x) = 1/(n-1) \cdot (S_{x2} - n \cdot \bar{x}^2)$

$s = \sqrt{1/(n-1) \cdot (S_{x2} - n \cdot \bar{x}^2)}$

$s_{\bar{x}} = \sqrt{s^2/n}$ = Streuung des Mittelwerts $\bar{x}$ der Varianten x_i

$s_{\bar{x}}$ würde man auch experimentell erhalten, wenn man immer aus derselben Grundgesamtheit wiederholt gleiche Stichproben mit Umfang n entnehmen würde; die so erhaltenen vielen Mittelwerte streuen dann um $\bar{x}$ herum mit einer statistischen Verteilung, die eine Normalverteilung, t-Verteilung oder anders geartete Verteilung sein kann.

b) Um spätere Doppelindizierung zu vermeiden, seien die Aktivitätsvarianten $A_i \mathrel{\hat{=}} x_i$; und $\bar{A} \mathrel{\hat{=}} \bar{x}$ gesetzt. Gegeben seien 4 Stichproben (S_j) mit ihren statistischen Maßzahlen: j = 1, 2, 3, 4.

$S_1 = \{n_1, \bar{x}_1, \sigma_1, s_1, s_{\bar{x}_1}\}$

$S_2 = \{n_2, \bar{x}_2, \sigma_2, s_2, s_{\bar{x}_2}\}$

$S_3 = \{n_3, \bar{x}_3, \sigma_3, s_3, s_{\bar{x}_3}\}$

$S_4 = \{n_4, \bar{x}_4 \quad \sigma_4, s_4, s_{\bar{x}_4}\}$

Um beispielsweise S_1 mit S_2 zu vergleichen, vergleicht man die Mittelwerte $\bar{x}_1$und $\bar{x}_2$, betrachtet ihre Differenz $d_{12} = /\bar{x}_1 - \bar{x}_2/$. Man muß also feststellen, ob die Differenz d_{12} zwischen den Mittelwerten $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ zufällig ist, so daß die beiden Stichproben zur gleichen Grundgesamtheit gehören, oder ob ein systematischer, signifikanter Unterschied d_{12} vorliegt, so daß die Stichproben $\left\{\begin{matrix} x_{1i} \\ 1 \end{matrix}\right\}$ und $\left\{\begin{matrix} x_{2i} \\ 1 \end{matrix}\right\}$ mit $p > 0.95$ nicht aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Die Differenzen d_{12} würden bei m-fach wiederholten Bestimmungen auch eine Normalverteilung besitzen. Der Streuungsbereich sd_{12} der Differenzen läßt sich auch wie folgt berechnen, und ist abhängig vom Umfang n_1 und n_2 der zu vergleichenden Stichproben S_1 und S_2.

c) Um die Differenz $d_{12} = / \bar{x}_1 - \bar{x}_2/$ auf Signifikanz

zu prüfen, müssen zunächst nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz die Varianzen der Mittelwerte addiert werden, um die Variante der Differenz zu erhalten.

$$sd_{12}^2 = s_{\bar{x}_1}^2 + s_{\bar{x}_2}^2$$
$$= s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2$$
$$= s_g^2 \cdot (1/n_1 + 1/n_2)$$
$$= s_g^2 \cdot (n_1+n_2)/(n_1 \cdot n_2), \text{ wobei}$$

$$s_g^2 = \frac{s_1^2 (n_1-1) + s_2^2 (n_2-1)}{(n_1 + n_2 - 2)} = \text{gewogene Varianz, die}$$

zu berechnen empfohlen wird, wenn die Stichproben $n_1<10$; $n_2<10$, also kleinen Umfangs sind. Dabei wird, für den folgenden t-Test noch der Begriff der Freiheitsgrade (FG) eingeführt.

FG = $n_1 + n_2 - 2$. Quadratwurzel aus der errechneten sd_{12}^2 - Varianz ergibt die gesuchte Streuung der Differenzen sd_{12}.

d) Dann wird die Abszisse t_{12} der vermuteten t-Verteilung von d_{12}-Varianten mit der Streuung sd_{12} bestimmt.

$$t_{12} = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \; / \; sd_{12}$$
$$= d_{12} \; / \; sd_{12}$$

e) Aus dem Integralwert $\int_{\infty}^{t_p} d\phi\ (t) / dt \cdot dt$ der t-Verteilung für den gewünschten Sicherheitsgrad (Signifikanzgrad) und den Freiheitsgrad FG $= n_1 + n_2 - 2$ ergibt sich aus der theoretischen t-Tabelle eine Abszisse t_p für die zu fordernde Signifikanz-Wahrscheinlichkeit.

z.B. p = 0.95; z.B. t0.95 = 1.703 für FG = 27

f) Prüfung:

Ist $t_{12} > t_{0.95}$, so ist d_{12} signifikant, mit $p > 0.95$

$t_{12} = t_{0.95}$, so ist d_{12} wahrscheinl. mit $p = 0.95$

$t_{12} < t_{0.95}$, so ist d_{12} weniger wahrscheinlich $p < 0.95$, also mehr oder weniger zufällig (Pätau, 1943).

2. Ergebnisse

2.1.1. GOT

Bei Lösungen von GOT in 0.9% NaCl nehmen die Aktivitäten während der Schüttelbehandlungen insgesamt ab. Dies ist durch Varianzanalysen mit Mittelwerten von gemessenen Aktivitäten für die gesamte Schüttelzeit signifikant erwiesen. Für die Differenzen der Mittelwerte norminierter Aktivitäten ist bei GOT die Abnahme der normierten Aktivitäten nachgewiesen. GOT ist das stabilste der hier untersuchten Enzyme. Selbst nach zweiminütigem Schütteln in 0.9% NaCl

ist noch 3/4 der ursprünglichen Aktivität vorhanden (Tab.11,12;Abb.6). Die Differenz der Mittelwerte $\bar{A}'_3$ für GOT und AP ist signifikant getestet, während $d_{12} = \bar{\bar{A}}'_{GOT} - \bar{\bar{A}}'_{AP}$ gerade nicht mehr statistisch gesichert ist.

2.1.2. GPT

Der Aktivitätsabfall durch Schütteln von GPT (Tab.1,2;Abb.1) in 0,9% NaCl ist durch Varianzanalyse signifikant gesichert. GPT in PS erleidet durch zweiminütige Schüttelung einen gerade noch signifikant nachweisbaren Aktivitätsverlust, den man aber nur an den normierten Aktivitätsmittelwerten beweisen kann. Die Stabilisierung von GPT in PS gegenüber GPT in 0,9% NaCl während der Schüttelbehandlungen ist jedoch hochsignifikant.

2.1.3. LDH

Sowohl bei LDH-Herz als auch bei LDH-Muskel in 0,9% NaCl konnte durch Varianzanalyse ein signifikanter Aktivitätsabfall nachgewiesen werden. Zwischen den beiden Isoenzymen erwiesen sich mit Hilfe des t-Tests die Unterschiede $\bar{A}_{4H} - \bar{A}_{4M}$, $\Delta\bar{A}'_{14M} - \Delta\bar{A}'_{14H}$ und $\bar{\bar{A}}'_H - \bar{\bar{A}}'_M$ als signifikant.

Der geprüfte signifikante Unterschied ($\bar{A}'_H - \bar{A}'_M$) besagt, daß im Durchschnitt LDH-Herz gegen Erschütterungen stabiler ist als LDH-Muskel, und daß die normierten Aktivitäten (A'_{jH}) bei LDH-Herz weniger streuen als die bei LDH-Muskel, was noch bestätigt, daß LDH-Muskel labiler ist als LDH-Herz. In Patientenserum konnten die Unterschiede für LDH-Herz und LDH-Muskel nach S_2, - nicht nach S_3 -, jedoch nach S_4 und für die gesamte Schüttelbehandlung S_j signifikant nachgewiesen werden. Somit ist LDH-Herz in PS und in 0,9% NaCl gegen mechanische Erschütterung stabiler als LDH-Muskel. Beide Isoenzyme werden durch PS stark stabilisiert (Tab.3,4;Abb.2).

2.1.4. CK

Der Aktivitätsabfall durch Schütteln von CK in 0,9% NaCl wurde durch t-Teste gesichert. Bei CK in PS ist der gesamte Aktivitätsverlust wesentlich kleiner, jedoch im t-Test mit den Mittelwerten der Aktivitätsvarianten fast noch als zufällig möglich (p_{12} = 6%). In ungeschüttelten Proben konnte durch t-Teste keine Stabilisierung durch PS nachgewiesen werden. Die stabilisierende Wirkung von PS ist durch die Differenzen $\bar{A}_{4P} - \bar{A}_4$, $\bar{A}'_{4P} - \bar{A}'_4$ und $\bar{A}'_P - \bar{A}'$ im

t-Test als hochsignifikant nachgewiesen. Von den untersuchten Enzymen war CK in 0,9% NaCl das instabilste, der stärkste Aktivitätsverlust ist bis zu 1 Minute Schüttelzeit (Tab.5,6; Abb.3).

2.1.5. AP

Bei Lösungen von AP in 0,9% NaCl nehmen die Aktivitäten während der Schüttelbehandlungen (S_j) insgesamt ab. Dies ist durch Varianzanalysen mit Mittelwerten von gemessenen Aktivitäten für die gesamte Schüttelzeit signifikant erwiesen. Für die Differenzen der Mittelwerte normierter Aktivitäten ist bei AP durch t-Teste die Abnahme der normierten Aktivitäten nachgewiesen. AP ist nach GOT das zweitstabilste Enzym (Tab.11,12; Abb.7).

2.1.6 G6P-DH

Bei G6P-DH sind die gemittelten Aktivitäten der ungeschüttelten Enzymproben in Patientenserum 1,43fach so groß wie die gemittelten Aktivitäten der entsprechenden ungeschüttelten Proben in 0,9% NaCl. Dieser Unterschied ist hochsignifikant (Tab.7,8;Abb.4). Die G6P-DH Aktivitäten fallen in 0,9% NaCl und in PS signifikant ab. Da $\bar{A}'_{4P} - \bar{A}'_4$ und auch $\bar{A}'_P - \bar{A}'$

signifikant sind, wirkt PS während der Schüttelbehandlung trotz Schütteleffekt stabilisierend.

2.1.7. AK

Die Varianten der Aktivitäten von AK haben eine große Varianz. Varianzen und Aktivitäten fallen durch die Schüttelbehandlungen sehr stark ab, weniger stark AK in PS. Die durchschnittlichen normierten Aktivitäten während den Schüttelbehandlungen bei AK_1, AK_2 und AK_3 unterscheiden sich hochsignifikant (Tab. 9,10; Abb.5).

Alle in 0,9% NaCl bearbeiteten Aktivitätswerte sind in den Tabellen 11,12 und Abbildungen 6,7 miteinander verglichen. Tabelle 13 hebt die Reihenfolge der Enzymstabilität und des mittleren Aktivitätsverlustes in 0,9% NaCl deutlich hervor. Vergleichswerte in Patientenserum sind in Tabelle 14, 15, 16 und Abbildung 8 dargestellt. Das mittlere Aktivitätsverhalten nach Schütteln in 0,9% NaCl und in PS ergibt eine vergleichbare Reihenfolge außer bei G6P-DH, das im Serum eines der instabilsten Enzyme ist. Es wird im Gegensatz zu den anderen Enzymen von Serum wenig stabilisiert. Eigentümlich ist, daß die Aktivitäten der Muskelenzyme bei Erschütterung am meisten abfallen.

2.2. Tabellen

Tabelle 1

Zusammenfassung der Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}_j$

für GPT

Schüttelbehandlung	S_1	S_2	S_3	S_4	
Schüttelzeiten (MIN)	0	0.5	1	2	
GPT	$\bar{A}_1$	$\bar{A}_2$	$\bar{A}_3$	$\bar{A}_4$	n
in 0.9% NaCl. 1:250	176.2	136.	94.7	67.9	9
GPT in PS	$\bar{A}_{1P}$	$\bar{A}_{2P}$	$\bar{A}_{3P}$	$\bar{A}_{4P}$	
in Pat-Ser.(PS), 1:250	110.6	108.6	106.4	104.6	7

Tabelle 2

Zusammenfassung der normierten Aktivitäten $\bar{A}'_j$ für GPT

Schüttelbehandlung	S_1	S_2	S_3	S_4	
Schüttelzeiten (MIN)	0	0.5	1	2	
GPT	$\bar{A}'_1$	$\bar{A}'_2$	$\bar{A}'_3$	$\bar{A}'_4$	n
	1000	772	537	385	9
GPT in PS	$\bar{A}'_{1P}$	$\bar{A}'_{2P}$	$\bar{A}'_{3P}$	$\bar{A}'_{4P}$	
	1000	982	962	946	7

Tabelle 3

Zusammenfassung der Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}_j$ für LDH

Schüttelbehandlung Schüttelzeiten (MIN)	S_1 0	S_2 0.5	S_3 1	S_4 2	
	$\bar{A}_1$	$\bar{A}_2$	$\bar{A}_3$	$\bar{A}_4$	n
LDH-Herz (in 0.9% NaCl, 1:3000)	279	201	172	123	9
LDH-Muskel(in 0.9%NaCl, 1:3000)	288	180	135	69	12
	$\bar{A}_{1P}$	$\bar{A}_{2P}$	$\bar{A}_{3P}$	$\bar{A}_{4P}$	
LDH-Herz (in PS, 1:3000)	226	228	218	216	4
LDH-Muskel (in PS, 1:3000)	184	178	172	150	4

Tabelle 4

Zusammenfassung der normierten Aktivitäten $\bar{A}'_j$ für LDH

Schüttelbehandlung	S_1	S_2	S_3	S_4	
Schüttelzeiten (MIN)	0	0.5	1	2	
	$\bar{A}'_1$	$\bar{A}'_2$	$\bar{A}'_3$	$\bar{A}'_4$	n
LDH-Herz (in 0.9% NaCl)	1000	720	616	441	9
LDH-Muskel (in 0.9% NaCl)	1000	625	469	240	12
	$\bar{A}'_{1P}$	$\bar{A}'_{2P}$	$\bar{A}'_{3P}$	$\bar{A}'_{4P}$	
LDH-Herz (in PS)	1000	1008	965	956	4
LDH-Muskel (in PS)	1000	967	935	815	4

Tabelle 5

Zusammenfassung der Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}_j$

für CK

Schüttelbehandlung Schüttelzeiten (MIN)	S_1 0	S_2 0.5	S_3 1	S_4 2	
CK	$\bar{A}_1$	$\bar{A}_2$	$\bar{A}_3$	$\bar{A}_4$	n
in 0.9% NaCl 1:2000	308	229	64	29	8
CK	$\bar{A}_{1P}$	$\bar{A}_{2P}$	$\bar{A}_{3P}$	$\bar{A}_{4P}$	
in PS 1:2000	379	358	317	307	6

Tabelle 6

Zusammenfassung der normierten Aktivitäten $\bar{A}'_j$ für CK

Schüttelbehandlung	S_1	S_2	S_3	S_4	
Schüttelzeiten (MIN)	0	0.5	1	2	
CK	$\bar{A}'_1$	$\bar{A}'_2$	$\bar{A}'_3$	$\bar{A}'_4$	n
	1000	744	208	94	8
CK in PS	$\bar{A}'_{1P}$	$\bar{A}'_{2P}$	$\bar{A}'_{3P}$	$\bar{A}'_{4P}$	
	1000	944	836	810	6

Tabelle 7

Zusammenfassung der Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}_j$ für G6PDH

Schüttelbehandlung	S_1	S_2	S_3	S_4	
Schüttelzeiten (MIN)	0	0.5	1	2	
G6PDH	$\bar{A}_1$	$\bar{A}_2$	$\bar{A}_3$	$\bar{A}_4$	n
(in 0.9% NaCl, 1:100)	26.1	20.7	16.2	18.9	3
	27.	24.3	23.4	17.1	3
(gemittelt)	26.5	22.5	19.8	18.	6
G6PDH	$\bar{A}_{1P}$	$\bar{A}_{2P}$	$\bar{A}_{3P}$	$\bar{A}_{4P}$	
(in PS, 1:100)	42.3	36.	31.5	25.2	3
	40.5	37.8	36.	33.3	3
(gemittelt)	41.4	36.9	33.8	29.2	6

Tabelle 8

Zusammenfassung der normierten Aktivitäten $\bar{A}'_j$ für G6P-DH

Schüttelbehandlung	S_1	S_2	S_3	S_4	
Schüttelzeiten (MIN)	0	0.5	1	2	
G6P-DH	$\bar{A}'_1$	$\bar{A}'_2$	$\bar{A}'_3$	$\bar{A}'_4$	n
	1000	850	748	680	6
G6P-DH in PS	$\bar{A}'_{1P}$	$\bar{A}'_{2P}$	$\bar{A}'_{3P}$	$\bar{A}'_{4P}$	
	1000	891	816	705	6

Tabelle 9

Zusammenfassung der Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}_j$

für AK

Schüttelbehandlung Schüttelzeiten (MIN)	S_1 0	S_2 0.5	S_3 1	S_4 2	
AK (Boehringer, Mannh.)	$\bar{A}_1$	$\bar{A}_2$	$\bar{A}_3$	$\bar{A}_4$	n
in 0,9% NaCl,1:100, AK 1	1047.5	581.9	427.2	171.3	20
AK (gereinigt) in 0.9% NaCl, 1:100, AK 2	511.	393.	334.	255.	10
AK (Boehringer, Mannh.)	$\bar{A}_{1P}$	$\bar{A}_{2P}$	$\bar{A}_{3P}$	$\bar{A}_{4P}$	
in Pat.-Ser.(PS),1:10^3,AK 3	243.	231.	231.	223.	3
in Pat.-Ser.(PS),1:100,AK 3	1375.	1390.	1250.	1210.	1

Tabelle 10

Zusammenfassung der normierten Aktivitäten $\bar{A}'_j$ für AK

Schüttelbehandlung	S_1	S_2	S_3	S_4	
Schüttelzeiten (MIN)	0	0.5	1	2	
AK(Boehringer,Mannh.)	$\bar{A}'_1$	$\bar{A}'_2$	$\bar{A}'_3$	$\bar{A}'_4$	n
AK 1	1000	556	408	164	20
AK (gereinigt) AK 2	1000	769	654	499	10
AK(Boehringer,Mannh.)	$\bar{A}'_{1P}$	$\bar{A}'_{2P}$	$\bar{A}'_{3P}$	$\bar{A}'_{4P}$	
in PS,1:103,AK 3	1000	950	950	920	3
in PS,1:100,AK 3	1000	1010	909	880	1
AK 3 (gemittelt)	1000	980	930	900	4

Tabelle 11

Zusammenfassung der Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}_j$
der in 0,9%iger NaCl gelösten Enzyme

Schüttelbehandlung	S_1	S_2	S_3	S_4	
Schüttelzeiten (MIN)	0	0.5	1	2	
	$\bar{A}_1$	$\bar{A}_2$	$\bar{A}_3$	$\bar{A}_4$	n
CK	308.	229.	64.	29.	8
AK 1	1047.5	581.9	427.2	171.3	20
GPT	176.2	136.	94.7	67.9	9
AK 2	511.	393.	334.	255.	10
G6P-DH	26.5	22.5	19.8	18.	6
GOT	148.2	144.	137.	112.4	5
LDH-Muskel	288.	180.	135.	69.	12
LDH-Herz	279.	201.	172.	123.	9
AP	119.4	108.	89.2	86.2	5

Tabelle 12

Vergleich der normierten Aktivitäten $\bar{A}'_j$
für die in 0,9%iger NaCl gelösten Enzyme

Schüttelbehandlung		S_1	S_2	S_3	S_4	Merkmale durchschn.			
Schüttelzeiten(MIN)		0	0.5	1	2	Schüttelwirkung			
	n	$\bar{A}'_1$	$\bar{A}'_2$	$\bar{A}'_3$	$\bar{A}'_4$	$\Delta\bar{A}'_{14}$	$\bar{\bar{A}}'$	$\bar{\bar{s}}'$	Zunahme der Stabilität
CK	8	1000	744	208	94	906	512	373.9	
AK 1	20	1000	556	408	164	836	532	304.3	
LDH-Muskel	12	1000	625	469	240	760	584	277.	
GPT	9	1000	772	537	385	615	674	233.5	
LDH-Herz	9	1000	720	616	441	559	694	203.	
AK 2	10	1000	769	654	499	501	731	182.7	
G6P-DH	6	1000	850	748	680	320	820	120.5	
AP	5	1000	908	748	723	277	845	114.3	
GOT	5	1000	972	924	758	242	914	93.8	

Tabelle 13

Mittleres Aktivitätsverhalten während der Schüttelzeit in 0,9%iger NaCl

	CK	<	AK1	<	LDH-M	<	GPT	<	LDH-H	<	AK2	<	G6PDH	<	AP	<	GOT
Enzymstabilität	512	<	532	<	584	<	674	<	694	<	731	<	820	<	845	<	914
Aktivitätsverlust	906	>	836	>	760	>	615	>	559	>	501	>	320	>	277	>	242

Tabelle 14

Zusammenstellung der Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}_{jP}$ der in Patientenserum gelösten Enzyme

Schüttelbehandlung	S_1	S_2	S_3	S_4	
Schüttelzeiten (MIN)	0	0.5	1	2	
	$\bar{A}_{1P}$	$\bar{A}_{2P}$	$\bar{A}_{3P}$	$\bar{A}_{4P}$	n
G6P-DH in PS (1:100)	41.4	36.9	33.8	29.2	6
CK in PS (1:2000)	379.	358.	317.	307.	6
LDH-Muskel in PS(1:3000)	184.	178.	172.	150.	4
AK 3 in PS (1:1000)	243.	231.	231.	223.	3
AK 3 in PS (1:100)	1375.	1390.	1250.	1210.	1
GPT in PS (1:250)	110.6	108.6	106.4	104.6	7
LDH-Herz in PS (1:3000)	226.	228.	218.	216.	4

Tabelle 15

Vergleich der normierten Aktivitäten $\bar{A}'_{jP}$ für die in Patientenserum (PS) gelösten Enzyme

Schüttelbehandlung		S_1	S_2	S_3	S_4	Merkmale durchschn.			
Schüttelzeiten (MIN)		0	0.5	1	2	Schüttelwirkung			
	n	$\bar{A}'_{1P}$	$\bar{A}'_{2P}$	$\bar{A}'_{3P}$	$\bar{A}'_{4P}$	$\bar{A}'_{14P}$	$\bar{\bar{A}}'_{P}$	$\bar{\bar{s}}'_{P}$	Zunahme der Stabilität ↓
G6P-DH in PS	6	1000	891	816	705	295	853	107.6	
CK in PS	6	1000	944	836	810	190	898	77.6	
LDH-M in PS	4	1000	967	935	815	185	929	69.9	
AK 3 in PS	4	1000	980	930	900	100	953	39.6	
GPT in PS	7	1000	982	962	946	54	973	20.4	
LDH-H in PS	4	1000	1008	965	956	44	982	22.2	

Tabelle 16

Mittleres Aktivitätsverhalten während der Schüttelzeit in Patientenserum

	G6P-DH	<	CK	<	LDH-M	<	AK 3	<	GPT	<	LDH-H
Enzymstabilität	853	<	898	<	928	<	953	<	973	<	982
Aktivitätsverlust	295	>	190	>	185	>	100	>	54	>	44

2.3. Abbildungen

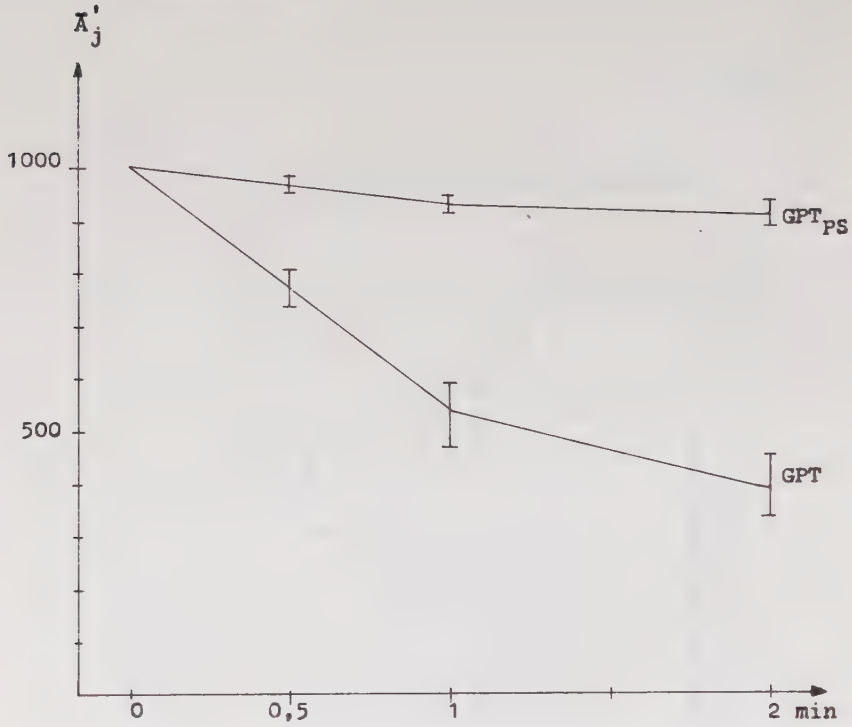


Abbildung 1

Normierte Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}'_j$ für GPT
(Aktivität 1000 für ungeschüttelte Proben)
GPT in 0,9% NaCl, 1:250, n=9(GPT)
GPT in Patientenserum, 1:250, n=7(GPT_{PS})

GPT : $\bar{A}'_2 \pm s_{\bar{x}} = 766 \pm 34$

$\bar{A}'_3 \pm s_{\bar{x}} = 532 \pm 58$

$\bar{A}'_4 \pm s_{\bar{x}} = 386 \pm 58$

GPT_{PS}: $\bar{A}'_{2P} \pm s_{\bar{x}} = 965 \pm 7$

$\bar{A}'_{3P} \pm s_{\bar{x}} = 927 \pm 14$

$\bar{A}'_{4P} \pm s_{\bar{x}} = 905 \pm 23$

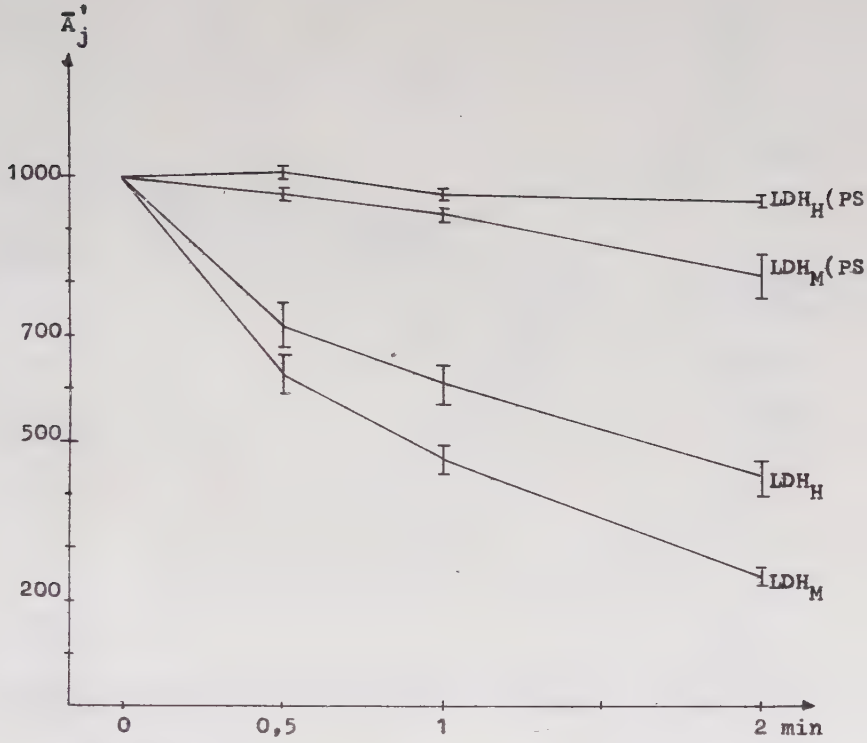


Abbildung 2

Normierte Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}'_j$ für LDH
(Aktivität 1000 für ungeschüttelte Proben)
LDH-Muskel in 0,9% NaCl 1:3000, n=12 (LDH_M)
LDH-Herz in 0,9% NaCl 1:3000, n= 9 (LDH_H)
LDH-Muskel in Patientenserum, 1:3000, n= 4 (LDH_{M-PS})
LDH-Herz in Patientenserum, 1:3000, n= 4 (LDH_{H-PS})

LDH_M : $\bar{A}'_{2M} \pm s_{\bar{x}}$ = 625±37; $\bar{A}'_{3M} \pm s_{\bar{x}}$ = 469±26; $\bar{A}'_{4M} \pm s_{\bar{x}}$= 245±1

LDH_H : $\bar{A}'_{2H} \pm s_{\bar{x}}$ = 717±45; $\bar{A}'_{3H} \pm s_{\bar{x}}$ = 609±39; $\bar{A}'_{4H} \pm s_{\bar{x}}$= 427±3

LDH_{M-PS} : $\bar{A}'_{2PM} \pm s_{\bar{x}}$ = 972± 4; $\bar{A}'_{3PM} \pm s_{\bar{x}}$ = 935±10; $\bar{A}'_{4PM} \pm s_{\bar{x}}$= 818±4

LDH_{H-PS} : $\bar{A}'_{2PH} \pm s_{\bar{x}}$ =1008±10; $\bar{A}'_{3PH} \pm s_{\bar{x}}$ = 967±15; $\bar{A}'_{4PH} \pm s_{\bar{x}}$= 959±

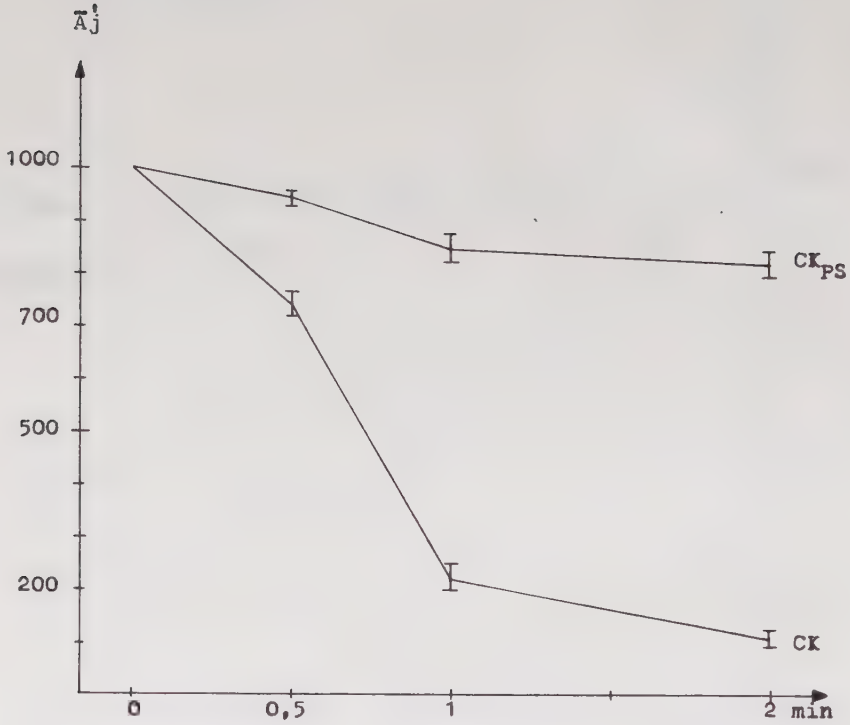


Abbildung 3

Normierte Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}'_j$ für CK
(Aktivität 1000 für ungeschüttelte Proben)
CK in 0,9% NaCl, 1:2000, n=8 (CK)
CK in Patientenserum, 1:2000, n=6 (CK_{PS})

CK : $\bar{A}'_2 \pm s_{\bar{x}} = 733 \pm 25$

$\bar{A}'_3 \pm s_{\bar{x}} = 214 \pm 16$

$\bar{A}'_4 \pm s_{\bar{x}} = 101 \pm 14$

CK_{PS} : $\bar{A}'_{2P} \pm s_{\bar{x}} = 944 \pm 10$

$\bar{A}'_{3P} \pm s_{\bar{x}} = 837 \pm 28$

$\bar{A}'_{4P} \pm s_{\bar{x}} = 812 \pm 24$

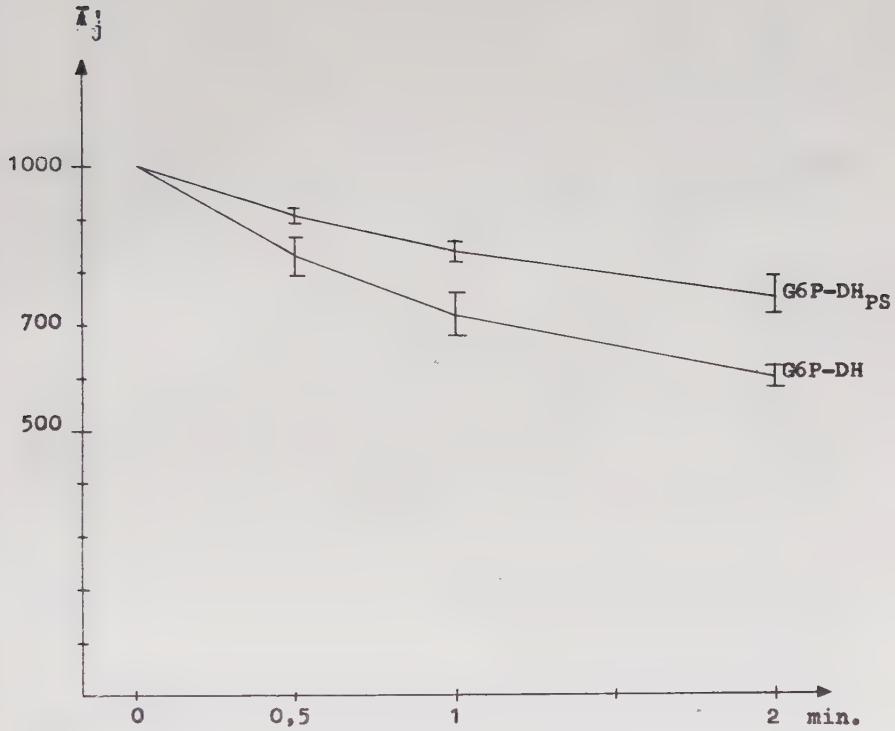


Abbildung 4

Normierte Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}'_j$ für G6P-DH
(Aktivität 1000 für ungeschüttelte Proben)

G6P-DH in 0,9% NaCl, 1:100, n=6 (G6P-DH)
G6P-DH in Patientenserum, 1:100, n=6 (G6P-DH$_{PS}$)

G6P-DH : $\bar{A}'_2 \pm s_{\bar{x}} = 829 \pm 38$;

$\bar{A}'_3 \pm s_{\bar{x}} = 720 \pm 41$;

$\bar{A}'_4 \pm s_{\bar{x}} = 601 \pm 49$

G6P-DH$_{PS}$: $\bar{A}'_{2P} \pm s_{\bar{x}} = 906 \pm 14$;

$\bar{A}'_{3P} \pm s_{\bar{x}} = 833 \pm 21$;

$A'_{4P} \pm s_{\bar{x}} = 756 + 37$

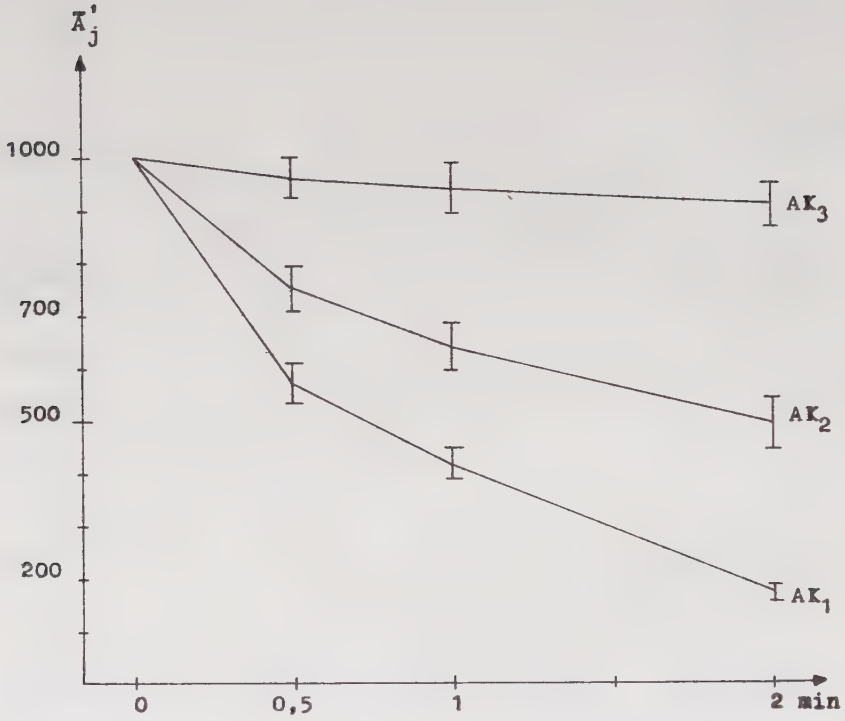


Abbildung 5

Normierte Aktivitätsmittelwerte $\bar{A}'_j$ für AK
(Aktivität 1000 für ungeschüttelte Proben)

AK_1 in 0,9% NaCl, 1:100, n=20

AK_2 gereinigtes Muskelhomogenat,
in 0,9% NaCl, 1:100, n=10

AK_3 in Patientenserum (PS), n= 4

AK_1: $\bar{A}'_{2\pm s_{\bar{x}}} = 569\pm41$; $\bar{A}'_{3\pm s_{\bar{x}}} = 418\pm28$; $\bar{A}'_{4\pm s_{\bar{x}}} = 172\pm14$.

AK_2: $\bar{A}'_{2\pm s_{\bar{x}}} = 750\pm40$; $\bar{A}'_{3\pm s_{\bar{x}}} = 638\pm42$; $\bar{A}_{4\pm s_{\bar{x}}} = 487\pm51$.

AK_3: $\bar{A}'_{2P\pm s_{\bar{x}}} = 959\pm39$; $\bar{A}'_{3P\pm s_{\bar{x}}} = 938\pm47$; $\bar{A}'_{4P\pm s_{\bar{x}}} = 905\pm41$.

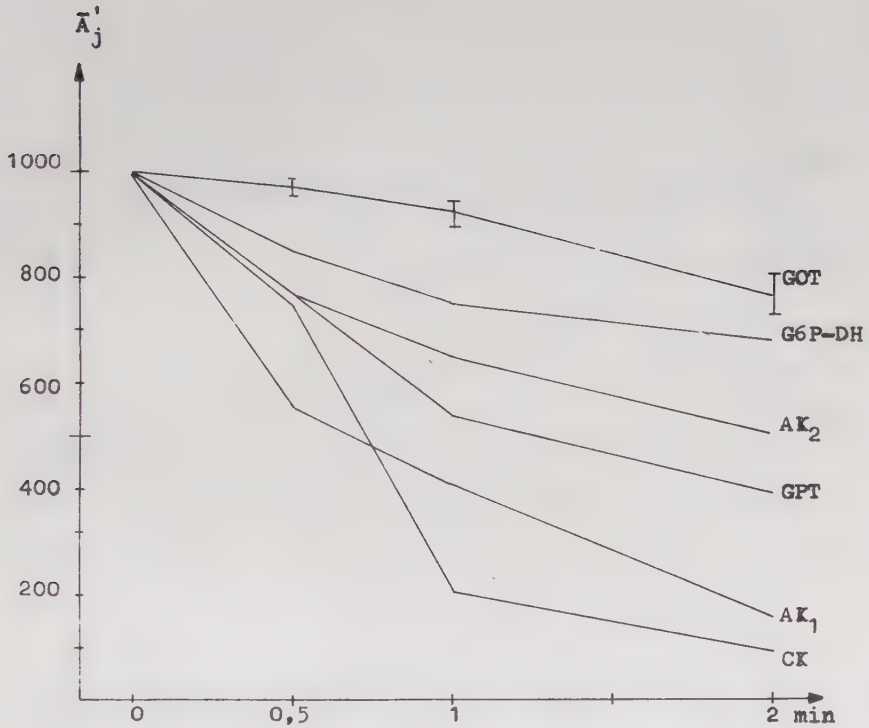


Abbildung 6

Vergleich der normierten Aktivitäten $\bar{A}'_j$
für die in 0,9%iger NaCl gelösten Enzyme

CK
AK_1
GPT
AK_2
G6P-DH
GOT : $\bar{A}'_2 \pm s_{\bar{x}} = 972 \pm 10$
$\bar{A}'_3 \pm s_{\bar{x}} = 926 \pm 24$
$\bar{A}'_4 \pm s_{\bar{x}} = 762 \pm 41$

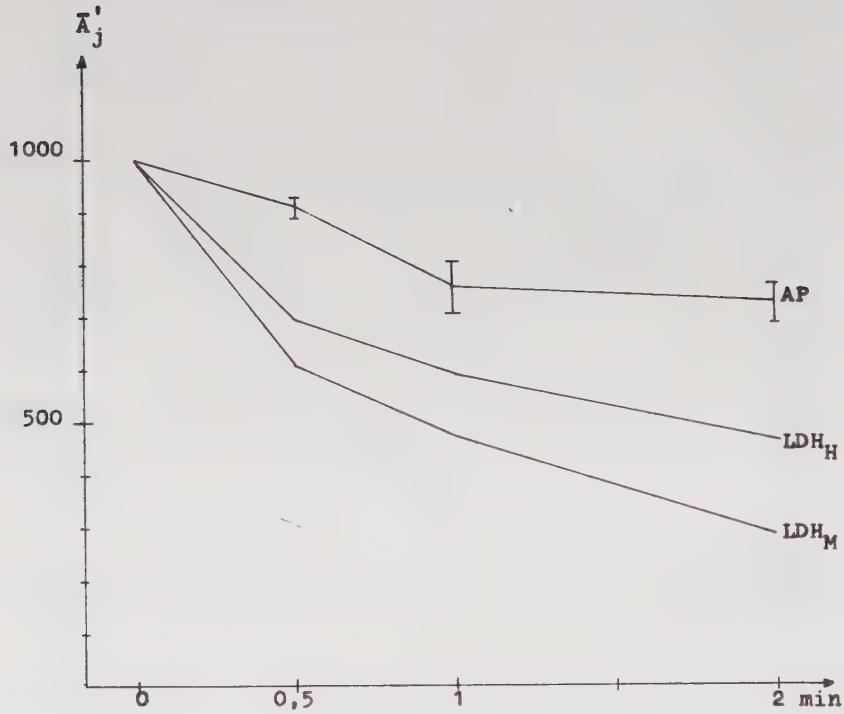


Abbildung 7

Vergleich der normierten Aktivitäten $\bar{A}'_j$

für die in 0,9% NaCl gelösten Enzyme

LDH-Muskel

LDH-Herz

AP : $\bar{A}'_2 \pm s_{\bar{x}} = 908 \pm 18$

$\bar{A}'_3 \pm s_{\bar{x}} = 756 \pm 49$

$\bar{A}'_4 \pm s_{\bar{x}} = 729 \pm 38$

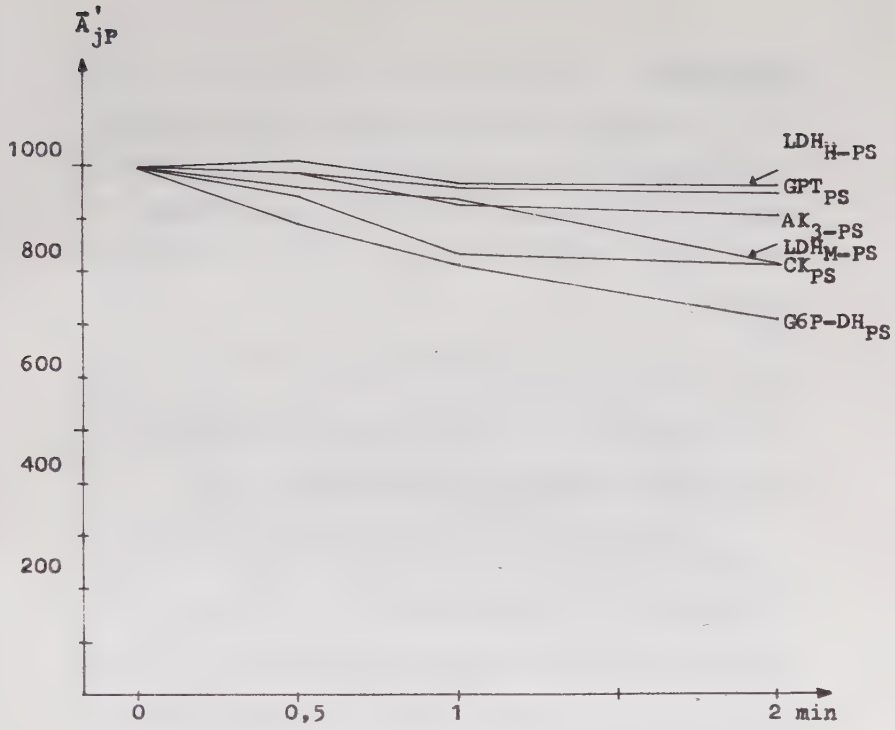


Abbildung 8

Vergleich der normierten Aktivitäten $\bar{A}'_{jP}$ für die in Patientenserum (PS) gelösten Enzyme

G6P - DH

CK

LDH-Muskel

AK_3

GPT

LDH-Herz

D. Diskussion

Die freie Energiedifferenz zwischen nativer Konformation der meisten globulären Proteine und den aufgefalteten Zuständen ist überraschend niedrig (Pace, 1975). Deshalb ist Denaturierung ein häufiges Ereignis.

Bei allen experimentellen Arbeiten ist es unsicher, ob nur ein denaturiertes Agenz beteiligt war. Schon lange ist ein additiver Effekt mehrerer Agentien (wie z.B.Hitze und pH) bekannt (Lewis, 1926).

Denaturierung an Oberflächen ist ein wichtiger Denaturierungsmechanismus (Lebherz, 1972). Oberflächenspannung kommt dadurch zustande, daß die Atome an der Oberfläche sich in einem asymmetrischen Kraftfeld befinden. Die freie Oberflächenenergie hängt von der chemischen Natur der Oberfläche, d.h. von der Art der chemischen Bindungen und Atome in der Oberfläche, von der Dichte der Oberfläche, d.h. von der Anzahl der chemischen Bindungen oder Atomgruppierungen pro cm^2 und der Orientierung der Atome und der Epitaxie (Anrade, 1973). Proteine reichern sich an der Oberfläche an, da sie die Oberflächenspannung erniedrigen (Zsigmondy, 1925). Im Allgemeinen werden sie durch die Oberflächenspannung denaturiert, breiten sich aus und

erfahren eine Umwandlung von einer z.B. globulären Struktur zu einem planen Polypeptid. Das gespreitete Molekül ist durch Proteasen besser angreifbar (Batman and Chambers, 1941). Um die Oberflächenspannung zu vermindern, wird auch von der Oberfläche die angrenzende Phase adsorbiert, z.B. an einer Flüssigkeits-Luftoberfläche könnte die Flüssigkeit den Sauerstoff der Luft adsorbieren und dadurch Oxydation oder anderen chemischen Veränderungen unterworfen sein (Anrade, 1973). Aktivitätsverlust durch Oxydation an der durch Schütteln vergrößerten Oberfläche ist jedoch unwahrscheinlich, da in dieser Arbeit Schütteluntersuchungen nach Überschichten der flüssigen Phase mit Stickstoff unternommen wurden, ohne daß eine signifikante Aktivitätsänderung zu den Kontrollproben beobachtet werden konnte. Schonhorn (1967 und 1968) konnte ebenfalls keine Oxydation entdecken.

In einem ausgebreiteten Film (Monolayer) bewegen sich die einzelnen Moleküle unabhängig und gleiten umeinander herum. Die Seitenketten der Proteingruppen können dabei ionisiert werden, die Moleküle können miteinander in Interaktion treten und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen gegensinnig geladenen Gruppen auftreten, so daß die Moleküle miteinander vernetzt werden (partielle Aggregation)

(Suzuki and Goto, 1972).

Beim Schütteln ändert sich die Oberfläche und der Druck, der darauf wirkt, Nachdem die Oberflächenspannung ein Maximum erreicht hat, kollabiert der Film und wird von der Oberfläche weggedrückt mit weiterer Kompression des Films (Suzuki and Goto, 1972). Ein Druck über 30dyn /cm^2 ist irreversibel und das Protein koaguliert (Mac Ritschie, 1963). Durch Verkleinern der Oberfläche (unter die kleinste Kompressibilität des Films, wo die Struktur am dichtesten gepackt ist), wird der Film zerstört.

In NaCl könnten die Salzionen die Struktur des Filmes ändern, indem sie sich mit dem Film verbinden und durch Änderung des elektrostatischen Feldes um das Protein die Filmstruktur starrer machen. Dadurch ist das höhere Oberflächenpotential zu erklären (Suzuki and Goto, 1972).

Ein wichtiger Denaturierungsmechanismus ist die Interaktion zwischen Glasoberfläche und Enzymmolekül. Dieser ist wesentlich stärker als die reversible Dissoziation von aktivem Enzym in inaktive Formen (Lebherz, 1972), wie z.B. bei Hämoglobin (Joly, 1965). Da eine Korrelation zwischen Enzymaktivierungsrate und positiver Ladung vorhanden ist, könnte die

Inaktivierung durch elektrostatische Anziehung zwischen positiv geladenen Enzymuntereinheiten und negativ geladener Glasoberfläche bedingt sein.

Ochsenserumalbumin und andere Proteine schützen gegen Inaktivierung an der Glasoberfläche, was durch Absättigung der Glasbindungsstellen erklärbar ist (Lebherz, 1972). Dies bestätigt auch die Ergebnisse dieser Arbeit, daß Enzym in Serum durchschnittlich stabiler als in physiologischer Kochsalzlösung ist.

Wenn Blut in Kontakt mit fremden festen Oberflächen kommt (wie z.B. Glas), führt die Adsorption der Proteine zur Koagulation (Baier et al., 1968), wobei Zellen besser an Glasoberflächen als an Kunststoff haften (Weiss and Blumenson, 1967). Gute Adhäsionsvorausbedingungen sind glatte Oberflächen und Freiheit von Staub und anderen Partikeln. Die Widerstandsfähigkeit der adhäsiven Verknüpfung gegenüber Scherkräften ist direkt abhängig von der Viskosität (Baier et al., 1968). Durch die Turbulenz beim Mischen tritt Scherinaktivierung auf (Charm and Wong, 1978). Bei großen Scherkräften wurde reversible Inaktivierung mit reversiblen Konformationsänderungen beobachtet. Urease wird nur dauerhaft durch Scherkräfte inaktiviert, wenn das Enzym Aggregate mit

hohem Molekulargewicht gebildet hat und dabei die SH-Gruppen von Cystein-Resten zerstört werden (Tirrell and Middleman, 1978). Der Aktivitätsverlust ist eine Funktion von Zeit und Scherrate (und der Geometrie des Röhrchens). Er ist unabhängig von intermittierenden oder andauernden Scherkrafteinflüssen bei gleicher Scherzeit und unabhängig von der Fließrate. Inaktivierung ist nicht wesentlich durch die Flüssigkeits-Luft-Grenzfläche beeinflußt, sondern durch das Brechen der Tertiärstruktur, wenn das Molekül im Scherfeld orientiert ist (Charm and Wong, 1970).

Es ist nicht zu erwarten, daß der Schereinfluß bei verschiedener Gestalt und Größe gleich ist. Nach unterschiedlichen Perioden von Scherkraftaussetzung gemessene enzymatische Scherinaktivierung von Catalase (MW 250 000), Carboxypeptidase (MW 34 000) und Labenzym (MW 30 000 - 40 000) sind unter einer Scherrate mal Expositionszeit von 10^4 vernachlässigbar (Charm and Wong, 1970). Bei dem größeren und komplexer strukturierten Enzym Urease (MW 483 000) ist diese Korrelation nicht möglich, allerdings wurde die Aktivität der Enzympräparation gemessen unter Schereinfluß (Tirrell and Middleman, 1975).

Bei Lactatdehydrogenase von Kaninchenmuskel (MW 140 000) ist die katalysierte Reaktion Pyruvat zu Laktat unbeeinflußt bis zu Scherraten von 1717/sec (d.h. von Scherkräften bis zu 2,1 Pa.). Bei Erhöhung der Scherkraft um Faktor 5 sank die Aktivität auf 50% des Ausgangswerts (Tirrell and Middleman, 1978). Die Inaktivierung ist unabhängig von der Scherrate und nur durch die Scherkraft kontrolliert, was auf direkte Moleküldeformation als Ursache schließen läßt. Anwesenheit von Pyruvat und NADH bietet keinen Schutz vor Scherung. Bei LDH ist die Inaktivierung teilweise irreversibel (Tirrell and Middleman, 1978).

Biologische Makromoleküle werden durch Ultraschall abgebaut (Pritchard et al., 1966). Bei Ultraschall werden mechanische Kräfte durch Höhlenbildung wirksam, es entsteht eine lokale Strömung in der Flüssigkeit, die zur Ausbildung von Geschwindigkeitsgradienten an benachbarten Oberflächen führt. Jedes feste Partikel, das in einer Flüssigkeit mit einem Geschwindigkeitsgradienten suspendiert ist, ist Scherkräften ausgesetzt und wird auch zur Rotation tendieren. Ein starres Partikel erleidet periodische Spannungskräfte. Größe und Gestalt der Partikel sind von Bedeutung. Große Partikel sind größeren Spannungs-

kräften ausgesetzt; die Kraft auf ein Partikel im Scherfeld wächst mit wachsender Partikelgröße (Maccalum et al., 1975).

Je höher das Molekulargewicht eines Proteins, desto mehr muß es von einer sphärischen Gestalt abweichen (Fisher, 1965). Je größer das Achsenverhältnis des Partikels, desto größer ist die Kraft auf die zentrale Region. Sehr ausgeprägt ist dieser Effekt bei hantelförmigen Partikeln. Asymmetrische Partikel sind ebenfalls größeren Scherkräften ausgesetzt. Es ist auch eine Abhängigkeit von der Intensität vorhanden (Thacker, 1973).

Vor Ultraschallinaktivierung (bis zu 25 min) von Lysozym schützt 0,1% Ochsenserumalbumin und 1% Mausserum fast total (Dietrich, 1962). Protektiven Effekt hat auch Glykogen und verschiedene Aminosäuren, wobei Schwefel enthaltende Substanzen die besten Resultate ergeben. Keinen Effekt haben Natriumchlorid, Magnesiumsulfat, Magnesiumchlorid und D-Glucose. Die schützenden Agentien bilden mit dem Enzym eine Enzym-Substrat-Komplex ähnliche Verbindung und schützen das ganze Enzym, nicht nur besondere Regionen. Der Schutz könnte durch Kompetition um verfügbare Oberfläche an der Gas-Flüssigkeitsgrenzfläche entstehen (Dietrich, 1962).

Denaturierte globuläre Proteine sind empfindlicher gegenüber proteolytischem Angriff wie native Proteine (Goldberg and Dice, 1974). Durch die raschere Spaltung der denaturierten Form wird bei Proteinen, die reversible Denaturierung unter bestimmten Bedingungen (z.B. Schütteln) eingehen, das Gleichgewicht in Richtung Denaturierung verschoben. Durch die Auffaltung werden zusätzliche Bindungen proteolytisch zugänglich. Selbst für Proteasenwirkung zugängliche Peptidbindungen auf der Proteinoberfläche werden, wenn sie auf einem relativ starren Peptidsegment liegen, erst nach Denaturierung gespalten.Das Auffalten gewisser Polypeptide steigert die proteolytische Aktivität um das 2-3fache (Fruton, 1975).

Die Vorstufen der Proteasen (=Zymogene) haben die Fähigkeit zur autokatalytischen Aktivierung durch limitierte Hydrolyse einer Peptidbildung (Kassell and Kay, 1973). Schütteln könnte der Auslöser zur Autokatalyse sein und so die Proteasen aktivieren.

Die Halbwertszeiten der verschiedenen Enzyme in den verschiedenen Geweben in vivo variieren sehr stark. So hat z.B. Rattenleber LDH 5 eine Halbwertszeit von 19 Tagen (Fritz et al., 1973), in Herzmuskel von 1,6 Tagen und in Skelettmuskel von 31 Tagen

(Fritz et al., 1969) gegenüber einer durchschnittlichen Proteinhalbwertszeit von 3,5 Tagen (Schimke, 1970). Alaninaminotransferase hat zum Beispiel im Skelettmuskel der Ratte eine wesentlich längere HWZ (20 Tage) als in Rattenleber (13 Tage) (Segal et al., 1969). Die verschiedenen HWZ könnten von verschiedenen Proteasesystemen oder von verschiedenen Liganden oder modifizierenden Enzymen herrühren (Millar et al., 1971).

Die Unterschiede in den Abbauraten in vivo sind verursacht durch die unterschiedliche Konformation der Proteine (Goldberg and Dice, 1974):

1) Veränderung der normalen Proteinkonformation wirkt sich auf die Abbaurate aus.
2) Die Abbaurate eines Proteins ist abhängig von dessen Gestalt und Größe.
3) Interaktionen eines Proteins mit kleinen Molekülen kann die Proteinkonformation und die Abbaurate ändern.
4) Die Abbaurate von Proteinen korrelliert mit ihrer Sensitivität gegenüber Proteasen in vitro (Brush, 1971; Katunuma, 1973).

Enzyme mit kurzer in vivo-HWZ werden in vitro schneller von Proteasen abgebaut als die Enzyme mit

langer in vivo-HWZ. Die Abbauraten zeigen keine Korrelation zur in vitro Hitzelabilität (Bond, 1971). Stabilität verschiedener Leberenzyme korreliert roh mit ihrer HWZ in vivo (Hopgood and Ballard, 1974).

Größere Proteine werden generell schneller abgebaut als kleinere (Dehlinger und Schimke, 1971). Und zwar hängt die Abbaurate von der Größe der Proteinuntereinheiten ab (Dice et al., 1973). Größere Proteine haben meist größere katalytische und regulatorische Verantwortlichkeiten. Durch ihre wichtige Stelle in den Stoffwechselwegen ist entsprechend den Stoffwechselerfordernissen ein rascher Umsatz (Abbau und Aufbau) nötig. Größere Proteine haben evtl. mehr Protease-sensitive Sites (größere Zielscheibe), evtl. größere sensitive Konformationsstellen für Proteolyse und sind oft weniger stabil in wässriger Umgebung, da sie ein kleineres Verhältnis von polaren zu nichtpolaren Seitenketten haben, oder auch lange, dünne Tertiärstrukturen (Fisher, 1964; Fisher,1965). Es ist auch weniger wahrscheinlich, daß größere Proteine, einmal denaturiert, sich zur nativen Konformation zurückfalten. In vitro ist Renaturierung für kleine Polypeptide leichter (Anfinsen, 1972).Größere Proteine enthalten wahrscheinlich mehr Fehler in der Amino-

säurensequenz pro Molekül oder Aminosäurenmodifikationen, die die Proteinkonformation ändern und so zu raschem Abbau führen.

Es gibt viele Ausnahmen von der Beobachtung, daß im allgemeinen die Korrelation zwischen Proteinhalbwertszeiten und Untereinheiten - Molekulargewicht gilt: Es sind einige Beispiele bekannt, daß kleine Proteine schnell abgebaut werden, aber es wurde von keinem Fall berichtet, wo ein großes Protein stabil gewesen wäre. Nicht nur die Größe beeinflußt also die Proteinhalbwertszeit. Determinanten für die Abbaurate sind noch die dem Enzym innewohnende Empfänglichkeit gegenüber Abbau und Assoziations-Dissoziationsrate der Untereinheiten. So werden z. B. die Untereinheiten von LDH gleich schnell abgebaut wie das Protein in seiner Quartärkonformation (Glass and Doyle, 1972).

Proteine mit kurzen Halbwertszeiten präzipitieren auch schneller aus der Lösung als stabile Zellkomponenten (Hanson et al., 1977). Eine Erklärung dieser Ergebnisse wäre, daß labilere Proteine mehr hydrophobe Reste auf der Oberfläche haben (Goldberg and St. John, 1976).

Im Säugetiergewebe werden Proteine mit

niedrigem isoelektrischem Punkt schneller abgebaut als solche mit neutralem oder basischem isoelektrischen Punkt (Dice and Goldberg, 1975). Auch in vitro dürfte die Proteinladung eine Rolle spielen. Stabile Proteine sollten also klein und basisch sein, was zum Beispiel Histone genau erfüllen.

Interaktionen mit kleinen Molekülen können durch Konformationsänderung die Eigenschaften der Polypeptide in vivo und in vitro ändern, unter anderem auch ihre Sensitivität gegenüber proteolytischen Enzymen (Citri, 1973). So schützt der Ligand Pyridoxalphosphat z. B. das Enzym GOT vor proteolytischem Angriff. Als Mechanismus wird angenommen, daß die Frequenz des "Atmens" (fortwährendes Auf- und Zurückfalten) der Proteine durch Anwesenheit von Liganden beeinflußt wird (Englander et al., 1972).

Durch das Schütteln könnte auch durch Konformationsänderung die Fähigkeit der Enzyme, stabilisierende Liganden zu bilden, abnehmen. Die geringere Stabilität der Enzyme in physiologischer Kochsalzlösung im Vergleich zu Serum könnte erklärt werden durch die größere Empfindlichkeit der Enzyme in Abwesenheit ihrer normalen Substrate oder Cofaktoren analog zum Hungern, wobei in tierischen- und Bakterienzellen der

Proteinabbau ansteigt (Pine, 1972; Goldberg, 1972).

Proteine können Brüche entlang ihrer Polypeptidkette akkumulieren, die deren Struktur oder biologische Aktivität nicht ändern (Richards and Vithayathil, 1960; Chaiken and Anfinsen, 1970; Uchida et al., 1973). Durch Schütteln könnten Konformationsänderungen oder solche Brüche der Polypeptidketten entstehen und dadurch besseren Angriff für Proteasen bieten. Eine wichtige Funktion des Proteinabbaus in vivo ist nämlich die Entfernung abnormaler Proteine (Goldberg and Dice, 1974), die bei gleicher Größe viel schneller denaturiert werden (Goldberg and St. John, 1976). Die hier beschriebenen Mechanismen sind für intrazelluläre Proteine und Serumproteine die gleichen (Goldberg and Dice, 1974), es gibt aber auch Ausnahmen, z.B. Tyrosinaminotransferase (Goldberg and St. John, 1976).

α-Helices sind Nukleationskerne beim Faltungsprozeß der Proteine, sie können stabil sein, selbst wenn der Rest des Moleküls aufgefaltet ist (Warshel and Levitt, 1976). Helixanteile sind auch stabiler gegenüber Proteasen. Glutaminsäure und Leucin sind helixstabilisierend und schützen vor proteolytischer Verdauung (Eckard and Cowgill, 1976),

ebenso Prolin und Hydroxyprolin (Traub and Fietzek, 1976), während Proteinanteile mit hohem Gehalt an die Helix destabilisierenden Aminosäuren, wie Arginin und Lysin rasch abgebaut wurden (Chow and Fasman, 1974).

Durch Einwirken von hohem hydrostatischem Druck werden die Aktivitäten von multimeren Enzymen (wie zum Beispiel die Dimere alkalische Phosphate oder Kreatinkinase) inhibiert, während Monomere (wie zum Beispiel Myokinase) eher noch stimuliert werden. Durch hydrostatischen Druck werden Protein - Protein - Interaktionen zerstört und Multimere dissoziieren und werden so inaktiviert (Penniston, 1971). Dies wirkt sich auch in der Ultrazentrifuge aus, wobei auf dem Boden des Röhrchens bei 40 000 rpm 50% Monomerisierung beobachtet wurde (Josephs and Harrington, 1967). Kreatinkinase hat eine lineare Inaktivierungskurve, während alkalische Phosphatase erst über einem Druck von 800 atm. abfällt, - dann allerdings mit ca. 3fach größerer Steigung wie CK (Penniston, 1971).

Je höher der Dissoziationsgrad, d.h. je weniger intaktes Enzym, desto schwieriger ist auch die Renaturierung und die Chancen für falsche Reaggregation zu intakten Polymeren steigt. So dürfte das intakte Enzym als Kristallisationskeim wirken und die richtige

Anordnung der dissaggregierten Ketten zurück in den aktiven Zustand erleichtern (Penniston, 1971).

Proteine, die Disulfidbrücken zwischen den Ketten haben, sind im allgemeinen gegenüber denaturierenden Einflüssen resistenter als Proteine ohne solche (Anfinsen, 1972). Jedoch spielen vielfältige nichtkovalente Interaktionen, wie hydrophobe- und Wasserstoffbrückenbindungen eine zusätzliche Rolle bei der Stabilisierung der makromolekularen Proteinstruktur und so enthalten viele Proteine mit relativ stabiler Makrostruktur keine Disulfidbrücken (wie z.B. Aspartataminotransferase aus Schweineherz) (Torchinskii, 1974). Auch nicht damit vereinbar ist, daß Thermolysin und MC60 Protease, beides hitzeresistente Enzyme, kein Cystin besitzen (Barach and Adams, 1977). Disulfidbrücken limitieren die Ausbreitung von Proteinen unter Denaturierungsbedingungen (Bull and Breese, 1975). Vielleicht gibt auch das Fehlen von Disulfidbrücken diesen Enzymen zusätzliche Flexibilität, die sie die denaturierende Behandlung leichter überleben läßt (Barach and Adams, 1977). Proteine mit Disulfidbrücken haben auch eine vergleichsweise geringe Renaturierungsrate wegen dem nicht geeigneten Zusammenpassen der Halbcysteinreste. Es sind auch nicht alle Disulfid-

brücken gleich wichtig für die Erhaltung von Struktur und Funktion. Jedoch sind manche enzymatisch aktive Proteine mit gespaltener Disulfidbrücke empfindlicher gegen tryptischen Angriff (Torchinskii, 1974).

Zu fragen ist noch, inwieweit der Aktivitätsabfall durch Schütteln in vitro Stoffwechselauswirkungen in vivo haben könnte. Lebedeva and Marokushin (1970) stellten in einer in vivo bei Ratten durchgeführten Messung der Aktivität einiger Atmungsenzyme im Skelettmuskel einen Aktivitätsabfall fast parallel mit ansteigender Vibrationszeit.

Tsvetkov and Popov (1973) berichten von Veränderungen im Chemismus der Zelle und Schädigungen durch Vibration. Gewebehypoxie durch Vasospasmus und starkem Aktivitätsabfall bei Katalase und Peroxidase. Der Energieverbrauch und die biologische Oxydation werden beschleunigt. Vibration konnte auch die durch Hunger induzierte Enzymsynthese teilweise unterdrücken (Miszczak et al., 1974). Kief et al. (1972) beobachteten bei Fahrradergometerübungen einen Enzymanstieg von CK in vivo.

Natürliche Glycoproteine als auch synthetische Protein-Glycokonjugate sind stabiler gegen Inaktivierung durch Hitze, Detergentien und Proteasen als die

entsprechenden nicht-glycosierten Präparationen (Christensen et al., 1976). Dafür könnten der größere Hydrationsgrad und die Verknüpfung zwischen Protein und Polysaccharid verantwortlich sein (Marshall and Rabinowitz, 1975). Auch besteht die Möglichkeit, daß der gebundene Kohlenhydratanteil die Tendenz des Polypeptids, zwischen verschiedenen Konformationen zu oszillieren, reduziert. Markus (1965) hat gezeigt, daß die Bindung eines kleinen Liganden an ein Protein die Empfindlichkeit des ganzen Proteins gegenüber Proteolyse reduziert. Er erklärt dies durch die Hypothese, daß die Bindung von Liganden die Tendenz des Polypeptids, zwischen den verschiedenen konformellen Zuständen zu oszillieren, reduziert und daß solche Oszillationen nötig sind, damit Proteolyse stattfinden kann. Die Resistenz gegenüber Proteasen ist auch teilweise durch den sterischen Einfluß der Kohlenhydratgruppen bedingt, die an der Oberfläche der Proteine lokalisiert sind (Christensen et al., 1976). Dies erklärt auch die große Stabilität der alkalischen Phosphatase, die ansonsten auf Grund ihrer hohen Molmasse instabil sein müßte.

Erstaunlich ist die geringe Stabilität der

Muskelenzyme in dieser Arbeit, da die Literaturdaten (siehe oben) für relativ lange HWZ der entsprechenden Enzyme im Skelettmuskel sprechen. Skelettmuskel wächst oder atrophiert in Reaktion auf verschiedene Faktoren wie Hormone, Arbeit, Mißbrauch oder Ernährungszustand und paßt sich so in seiner Größe an, was dem Lebewesen großen selektiven Vorteil gibt (Goldspink, 1977). Dies könnte ermöglicht werden durch schnelle Degradation der Muskelproteine und/oder rasche Proteinsynthese. Bird und Schwarz (1977) konnten zahlreiche Lysosomen und Proteasen nachweisen, die für den Proteinabbau verantwortlich sind.

Reversible Aggregate werden durch sanftes Schütteln zerstört. Bei Proben, die weniger NaCl enthalten, wirken sich die mechanischen Vibrationen stärker aus, d.h. Aggregate bilden sich langsamer, wahrscheinlich bedingt durch die geringe Dichte der Aggregate (Heller, 1941). Romanov et al. (1969) diskutieren bei mechanischer Vibration der Frequenz 200/sec Zerstörung der Proteinstruktur durch Resonanz und einen Schift der verschiedenen Strukturen gegeneinander durch deren verschiedene Dichten. Durch Unruhe in der statischen Struktur des Proteinmoleküls nimmt die konformelle Stabilität ab (Abaturov et al., 1976).

Zur Simulation der Transportbedingungen in einem fahrenden Untersuchungsfahrzeug wurden eine Gruppe von Seren vor der täglichen Bestimmung 3 Stunden lang bei 5°C gerüttelt. Dies Führte jedoch nicht zu meßbaren Effekten auf die 12 im Autoanalyser analysierten Bestandteile unter anderem auch Lactatdehydrogenase, Aspartattransaminase und alkalische Phosphatase (Hoffmeister und Junge, 1970). Zum gleichen Ergebnis kamen Feissli und Mitarbeiter (1966) bereits bei einigen Enzymen.

Die in meiner Arbeit verwendeten Enzyme entstammen nicht Humanseren und haben daher andere Stabilitätsmerkmale. Sie können nur mit Einschränkungen mit diesen Literaturdaten verglichen werden.

E. Zusammenfassung

Meine Ergebnisse über Schüttelstabilität decken sich recht gut mit den in der Literatur beschriebenen Stabilitätsdaten. CK ist sowohl bei Schütteln als auch bei Lagerung (Feissli et al., 1966) das instabilste der untersuchten Enzyme, gefolgt von AK, das bei Lagerung (Brownson and Spencer, 1972) und mechanischer Erschütterung ebenfalls sehr empfindlich ist; AK ist

gegenüber Hitze relativ stabil (Colowick and Kalckar, 1943; Bargoni, 1958). Gereinigte AK (AK_2) ist jedoch ebenfalls instabil gegenüber Hitzebehandlung (Bowen and Kerwin, 1956). Nur etwas stabiler gegenüber Erschütterung ist GPT, was sich mit der Lagerungs- und Hitzestabilität (Schmidt und Schmidt, 1976) deckt.

LDH folgt in der Stabilitätsreihe, wobei auch wie bei der Schüttelempfindlichkeit das H-Isoenzym gegenüber Hitze und Lagerung stabiler als das Muskelenzym ist. In meiner Arbeit konnte ich generell eine größere Empfindlichkeit der Muskelenzyme feststellen. Dies deckt sich nicht mit den Literaturdaten für AK (Todd and Baron, 1965) und CK (Keutel et al., 1972). G6P-DH und AP sind beide relativ stabil gegenüber Schütteln und Lagerung (Schmidt und Schmidt, 1976). Daß große Polypeptide schneller degradieren bzw. empfindlicher gegen Denaturierung sind (Glass and Doyle, 1972), konnte ich nicht bestätigen. Dies deckt sich auch nicht mit den übrigen Stabilitätsdaten der von mir untersuchten Enzyme. Nur bei GPT wäre dies eine Erklärung für die geringere Stabilität im Vergleich zu GOT.

Eine Korrelation zwischen Achsenverhältnis bzw. asymmetrischer Gestalt kann ebenfalls nur bedingt zur

Erklärung der Denaturierungsempfindlichkeit herhalten. Dies würde für die empfindlichen Enzyme CK und AK gelten, jedoch widerspricht dem die hohe Stabilität von GPT mit dem hohen Reibungsquotient und Achsenverhältnis und auch die globuläre Form der LDH-Untereinheiten.

Daß Liganden vor Denaturierung schützen, konnte nicht gezeigt werden, da GPT, bei dem Pyridoxalphosphat sehr viel fester an das Enzym gebunden ist wie bei GOT, viel instabiler ist.

AK mit seinem relativ hohen Anteil an den helixdestabilisierenden Aminosäuren könnte die Beobachtung von Chow und Fasman (1974) stützen, daß Proteine mit hohem Gehalt an die Helix destabilisierenden Aminosäuren wie Arginin und Lysin rasch abgebaut werden. Vielleicht trägt der hohe Gehalt von Prolin und aromatischen Aminosäuren bei GOT zu dessen Stabilität bei, ebenfalls die relativ geringe Anzahl an schwefelhaltigen Aminosäuren.

Daß kleine und basische Moleküle eine geringere Abbaurate haben (Goldberg and St. John, 1976), bringt keine Erklärung für das Stabilitätsverhalten der hier untersuchten Enzyme.

AK, ziemlich instabil, hat relativ wenig saure

und viel basische Aminosäuren und eine geringe Molmasse. Das LDH-Muskelenzym ist basischer als LDH aus Schweineherz, ist jedoch weniger stabil. Auf Grund der großen Molmasse müßte AP ebenfalls instabiler sein. Die Stabilitäten lassen sich auch nicht durch die unterschiedliche Anzahl der SH-Gruppen erklären.

F. Ausblick

Um das Problem weiter zu klären, könnte man folgende fortführende Versuche unternehmen:

Durch Stehenlassen der Proben nach dem Schütteln für einige Stunden und anschließend nochmalige photometrische Messung könnte man auf die Reversibilität der Denaturierung schließen.

Die Veränderungen durch das Schütteln (andere Konformation, kleinere Proteinbruchstücke) könnten eventuell durch Elektrophorese oder Chromatographie demonstriert werden. Es könnte gezeigt werden, ob andere Enzyme ebenfalls die Eigenschaft der sauren Phosphatase haben, wo die schneller wandernden Banden weniger stabil sind als die langsamer wandernden (Harris et al., 1968). So ist zum Beispiel auch AK 1 stabiler als AK 2-1 (Brownson and Spencer, 1972). Die

Korrelation zwischen Stabilität und elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit wurde auch von Wróblewsky and Gregory (1961) gezeigt, die durch Hitzestabilitätstests zwischen schnell und langsam wandernden Isoenzymen unterschieden.

Eingehendere Versuche unter Einleitung von flüssigem Stickstoff würden die Oxydation durch den Luftsauerstoff eliminieren und so den Denaturierungsmechanismus erhellen.

Versuche mit Proteaseinhibitoren könnten die Hypothese erhärten, daß durch Schütteln Carboxy- oder Aminopeptidasen aktiviert werden.

Um die Einflüsse durch Hydratation zu mindern, könnten die Schüttelexperimente jeweils in einer isoelektrischen Lösung durchgeführt werden.

Die konformellen Beiträge, die die Empfindlichkeit für Proteasen und Abbau in vivo bestimmen (Goldberg and Dice, 1974), wären näher zu spezifizieren.

Vergleichende Versuche mit in vivo Schüttelbehandlungen wären interessant, obwohl die Ergebnisse in vitro nicht ohne weiteres auf die viel komplizierteren Prozeße in vivo zu übertragen sind, und die in vitro-Experimente auf einem Versuchssystem mit teils unphysiologischen Konzentrationen von Substrat,

Coenzym und Enzym beruhen.

Scherinaktivierung von Enzymen sollte auch bei der Mikrozirkulation in vivo erforscht werden, wobei Plasmaenzyme intermittierend größeren Scherraten ausgesetzt sind als in dieser Arbeit (Charm and Wong, 1970). Insbesondere wäre zu prüfen, ob bei alten Menschen, analog zu den Ergebnissen von Wiederanders et al. (1977), die durch in vitro-Experimente bei älteren Tieren einen reduzierten Proteinabbau feststellten, die Serumenzyme unterschiedliches Stabilitätsverhalten zeigen.

Durch radioaktive Markierung könnte geprüft werden, ob alte (gealterte) Enzymmoleküle in verstärktem Ausmaß fragmentiert werden.

Da bei dieser Arbeit die Aktivitäten nicht während des Schüttelns, sondern erst nach einer durch Transport vom Schüttelgerät zum Photometer und Pipettieren zwangsläufig erfolgenden Pause gemessen wurden, wobei bei den verschiedenen Enzymen unterschiedliche Denaturierungsraten erfolgen können, brächten weitere Versuche mit Messungen während des Schüttelns besser vergleichbare Ergebnisse.

Multiple Formen von mitochondrieller Malatdehydrogenase, die als verschiedene Konfigurationen derselben Polypeptidkette angesehen werden (Kitto et al., 1966), oder auch Unterformen von GOT (Martinez -

- Carrion et al., 1967), wären gute Untersuchungsmodelle, um Beziehungen zwischen Struktur und Schüttelempfindlichkeit zu klären oder den Mechanismus der Denaturierung herauszufinden. Geeignet wären ferner gleiche Isoenzyme verschiedener Spezies, die sehr geringe Unterschiede aufweisen, wohingegen H- und M-LDH's der gleichen Spezies sehr verschiedene Proteine darstellen. Lohnend könnten eventuell durch in vitro durch Jodination, Desaminierung u.a. abgewandelte Konformeren mit fast identischer Struktur für weitere Untersuchungen sein.

G. Literaturverzeichnis

ABATUROV, L.V., N.N. YAKOBASHVILY, S.SH. JINORIA, T.P. MOLCHANOVA and YA.M. VARSHAVSKY: Effect of Intersubunit Contact on Intramolecular Conformational Motility (Conformational Stability) of Hemoglobin AS Revealed by Hydrogen Exchange. FEBS Letters 70, 127 - 130 (1976).

ADAMS, M.J., G.C. FORD, R. KOEKOEK, P.J. LENTZ, Jr., A. McPHERSON, Jr., M.G. ROSSMANN, I.E. SMILEY, R.W. SCHEVITZ, A.J. WONACOTT: Structure of Lactate Dehydrogenase at 2,8 Å Resolution. Nature 227, 1098 - 1103 (1970).

AMELUNG, D., L. HOFMANN und L. OTTO: Untersuchungen zur Haltbarkeit der Ferment-Aktivität im Serum. Dtsch.med.Wschr. 91, 851 - 853 (1966).

ANDREWS, P.: The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weights over a Wide Range. Biochem.J. 96, 595 - 606 (1965).

ANFINSEN, C.B.: The Formation and Stabilisation of Protein Structure.
Biochem.J. 128, 737 - 749 (1972)

ANFINSEN, C.B.: Principles that Govern the Folding of Protein Chains.
Science 181, 223 - 230 (1973)

ANRADE, J.D.: Interfacial Phenomena and Biomaterials.
Medical Instrumentation, 7, 110 - 120 (1973)

BAIER, R.E., E.G. SHAFRIN and W.A. ZISMAN: Adhesion: Mechanisms that Assist or Impede it.
Science 162, 1360 - 1368 (1968)

BARACH, J.T. and D.M. ADAMS: Thermostability at Ultrahigh Temperatures of Thermolysin and a Protease from a Psychotrophic Pseudomonas.
Biochim. Biophys. Acta 485, 417 - 423 (1977).

BARGONI, N.: Über die thermische Inaktivierung der Adenylat-Kinase des quergestreiften Kaninchenmuskels.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 311, 173 - 177 (1958).

BARMAN, TH.E.: Enzyme Handbook, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1969.

BATEMAN, J.B. and L.A. CHAMBERS: "Surface Elasticity" of Protein Films II. Properties of Partially and of Completely Spread Films. Journ.Phys.Chem. 45, 209 - 222 (1941)

BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim und New York: Verlag Chemie 1962.

BERGMEYER H.U.: Grundlagen der enzymatischen Analyse.Weinheim und New York: Verlag Chemie 1977.

BERTLAND, L.H. and N.O. KAPLAN: Chicken Heart Soluble Aspartate Aminotransferase. Purification and Properties. Biochemistry 7, 134 - 142 (1968)

BIRD, J.W.C. and W.N. SCHWARTZ: Intracellular Protein Catabolism in Muscle,pp. 167 - 182 in V. TURK and N. MARKS, ed. Intracellular Protein Catabolism II, New York and London: Plenum Press 1977.

BOND, J.S.: A Comparison of Proteolytic Susceptibility of Several Rat Liver Enzymes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 333 - 339 (1971).

BOWEN, W.J. and T.D. KERWIN: The Kinetics of Myokinase. II. Studies of Heat Denaturation, the Effects of Salts and the State of Equilibrium. Arch. Biochem. Biophys. 64, 278 - 284 (1956).

BOYD, J.W.: The Intracellular Distribution, Latency and Electrophoretic Mobility of L-Glutamate-Oxalacetate Transaminase from Rat Liver. Biochem. J. 81, 434 - 441 (1961).

BRANDTS, J.F.: Conformational Transitions of Proteins in Water and in Aqueous Mixtures. In: Structure and Stability of Biological Macromolecules TIMASHEFF, S.N.; FASMAN, G.D. (eds.) pp 213 - 290, New York: Marcel Dekker 1969.

BRAUNSTEIN, A.E.: Amino Group Transfer in P.D. BOYER, The Enzymes 9, 379 - 481, New York and London: Academic Press 1973.

BRAUNSTEIN A.E. und KRITZMANN: Über den Ab- und Aufbau von Aminosäuren durch Umaminierung.
Enzymologia 2, 129 - 137 (1937).

BROCK, D.H.J. and O. MAYO: The Biochemical Genetics of Man. p. 3 - 38, London: Academic Press 1972.

BROWNSON, C. and N. SPENCER: Partial Purification and Properties of the Two Common Inherited Forms of Human Erythrocyte Adenylate Kinase.
Biochem. J. 130, 797 - 803 (1972).

BRUSH, J.S.: Purification and Characterisation of a Protease with Specitity for Insulin from Rat Muscle.
Diabetes 20, 140 - 145 (1971).

BULL H.B. and K.BREESE: Stability of Proteins in Guanidine - HCL Solutions.
Biopolymers 14, 2197 - 2209 (1975).

CARTER J.E., E.F. GRAHAM, R.C. LILLEHEI and P.L. BLACKSHEAR: The Effect of High Hydrostatic Pressure and Low Temperature on Lactic Dehydrogenase and Glutamic Oxalacetic Transaminase. Cryobiology 8, 524 - 534 (1971).

CHAIKEN,J.M. and C.B. ANFINSEN: A Study of the Role of Histidine Residue 46 in Staphylococcal Nuclease by Solid Phase Peptide Synthesis. Journ. Biol. Chem. 245, 2337 - 2341 (1970).

CHARM, S.E. and B.L. WONG: Enzyme Inactivation with Shearing. Biotechnology and Bioengineering 12, 1103 - 1109 (1970).

CHARM, S.E. and B.L. WONG: Shear Inactivation in Mixing Biological Material. Biotechnology and Bioengineering 20, 451 - 453 (1978).

CHILSON, O.P., G.B. KITTO and N.O. KAPLAN: Factors Affecting the Reversible Dissociation of Dehydrogenases. Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 1006 - 1014 (1965a).

CHILSON, O.P., L.A. COSTELLO and N.O. KAPLAN: Effects of Freezing on Enzymes. Fed. Proc. 24, Suppl. 15, S-55 - S-65 (1965b)

CHOW, P.Y. and G.D. FASMAN: Conformational Parameters for Amino Acids in Helical, β-Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins. Biochemistry 13, 211 - 222 (1974)

CHRISTENSEN, T.B., G. VEGARUD and A.J. BIRKELAND: Stabilisation of Enzymes by Glycosylation. Process Biochemistry 11, 25 - 26 (1976).

CITRI N.: Conformational Adaptibility in Enzymes. Adv. Enz. 37, 397 - 648 (1973).

COHEN, L.A.: Group-Specific Reagents in Protein Chemistry. Ann. Rev. Biochem. 37, 695 - 726 (1968).

COLOWICK, S.P. and M. KALCKAR: The Role of Myokinase in Transphosphorylations. I. The Enzymatic Phosphorylation of Hexoses by Adenyl Pyrophosphate. Journ.Biol.Chem. 148, 117-126 (1943).

CONN, R.B.,Jr. and V. ANIDO: Creatine Phosphokinase Determination by the Fluorescent Ninhydrin Reaction. Am. J. Clin. Path. 46, 177 - 184 (1966).

CORMAN, L. and N.O. KAPLAN: Kinetic Studies of Dogfish Liver Glutamate Dehydrogenase with Diphosphopyridine Nucleotide and the Effect of Added Salts. Jorn. Biol. Chem. 242, 2840 - 2846 (1967)

COWMAN, R.A. and M.L. SPECK: Low Temperature as an enviromental Stress on microbial Enzymes. Cryobiology 5, 291 - 299 (1969).

CRASSER, R.: In-vitro-Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Adenylatkinase und verschiedenen Inhalationsanästhetika in Beziehung zum Krankheitsbild der Malignen Hyperthermie. Tübingen: Dissertation 1980.

DARBYSHIRE, B.: The Results of Freezing and Dehydration of Horseradish Peroxidase. Cryobiology 12, 276 - 281 (1975).

DAVIES, D.F.: Effects of Freezing and Thawing Serum and Plasma on Selected Quantitative Recoveries. Cryobiology 5, 87 - 95 (1968).

DEHLINGER, P.J. and R.T. SCHIMKE: Effect of Size on the Relative Rate of Degradation of Rat Liver Soluble Proteins. Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, 1473 - 1480 (1970).

DEMETRIOU, J.A., P.A. DREWES, J.B. GIN in R.J. HENRY, D.C. CANNON and J.W. WINKELMAN, ed.: Clinical Chemistry, Principles and Technics, Chapter 21, Enzymes, p. 815 - 1001, Second Edition, Hagerstown, New York and London: Harper and Row Publishers 1974.

DICE, J.F. and A.L. GOLDBERG: Relationship between in vivo Degradative Rates and Isoelectric Points of Proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72, 3893 - 3897(1975).

DICE, J.F., P.J. DEHLINGER and R.T. SCHIMKE: Studies on the Correlation between Size and Relative Degradation Rate of Soluble Proteins. Journ. Biol. Chem. 248, 4220 - 4228 (1973).

DIETRICH, F.M.: Inactivation of Egg-white Lysozyme by Ultrasonic Waves and Protective Effect of Amino Acids. Nature 195, 146 - 148 (1962).

DI SABATO, G.: The Role of the Tyrosyl Groups on the Mechanism of Action of Chicken Heart Lactic Dehydrogenase. Biochemistry 4, 2288 - 2296 (1965).

DI SABATO, G., A. PESCE and N.O. KAPLAN: The Sulfhydryl Content of Some Lactate Dehydrogenases. Biochem. Biophys. Acta 77, 135 - 138 (1963).

DIXON,M. and E.C. WEBB: Enzymes, 3.ed. London: Longman Group Ltd. 1979.

DOMAGK, G.F., R. CHILLA, W. DOMSCHKE, H.J.ENGEL und N. SÖRENSEN: Untersuchungen über Proteinstruktur und Enzymaktivität, I. Darstellung und Eigenschaften kristallisierter Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Candida utilis. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 626 - 634 (1969).

DOMSCHKE, W., C. von HINÜBER und G.F. DOMAGK: Untersuchungen über Proteinstruktur und Enzymaktivität VII. Cysteinreste in der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Candida utilis. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 194 - 196 (1970).

EBELING, J., C.A.M. MEIJERS and J.B.F. SPIJKERS: A Control Serum for U.V. Spectrophotometric Assay of GOT and GPT. Clin. Chim. Acta 27, 214 - 215 (1970).

ECKARD, E.E. and R.W. COWGILL: The Structure and Stability of Trypsin-resistant Segments from Rabbit Tropomyosin. Biochim. Biophys. Acta 434, 406 - 418 (1976).

ENGEL, H.J., W. DOMSCHKE, M. ALBERTI and G.F. DOMAGK: Protein Structure and Enzymatic Activity. II. Purification and Properties of Cristalline Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Candida utilis. Biochim. Biophys. Acta 191, 509 - 516 (1969).

ENGLANDER, S.W., N.W. DOWNER and H. TEITELBAUM: Hydrogen Exchange. Ann. Rev. Biochem. 41, 903 - 924 (1972).

ENGSTRÖM, L.: Studies on Calf-Intestinal Alkaline Phosphatase. 1. Chromatographic Purification, Microheterogenity and some other Properties of the Purified Enzyme. Biochim. Biophys. Acta 52, 36 - 48 (1961).

ENGSTRÖM, L.: The Amino Acid Sequence around the reactive Serin in Calf-Intestinal Alkaline Phosphatase. Biochim. Biophys. Acta 92, 79 - 84 (1964).

EVERSE, J. and N.O. KAPLAN: Lactate Dehydrogenases: Structure and Function. Adv. Enzymol. 37, 61 - 133 (1973).

FASELLA, P. and G.G. HAMMES: An Optical Rotary Dispersion Study of Aspartic Amino Transferase. Biochemistry 3, 530 - 535 (1964).

FASELLA, P. and G.G. HAMMES: Ultraviolet Rotary Dispersion of Aspartic Aminotransferase. Biochemistry 4, 801 - 805 (1965).

FASOLD, H.: Die Struktur der Proteine, Weinheim: Verlag Chemie 1972.

FEISSLI, S., G. FORSTER, G. LAUDAHN, E. SCHMIDT und F.W. SCHMIDT: Normal-Werte und Alterung von Hauptketten-Enzymen im Serum.
Klin. Wochenschr.44, 390 - 396 (1966).

FISHER, H.F.: A Limiting Law relating the Size and Shape of Protein Molecules to their Composition.
Proc. Nat. Acad. Sci.(USA) 51, 1285 - 1291 (1964).

FISHER, H.F.: An upper Limit to the Amount of Hydration of a Protein Molecule. A Corollary to the "Limiting Law of Protein Structure",
Biochim. Biophys. Acta 109, 544 - 550 (1965).

FONDY, TH.P. and N.O. KAPLAN: Structural and Functional Properties of the H and M Subunits of Lactic Dehydrogenases.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 119, 888 - 904 (1965).

FOSSET, M., D. CHAPPELET-TORELO and M. LAZDUNSKI: Intestinal Alkaline Phosphatase. Physical Properties and Quarternary Structure.
Biochemistry 13, 1783 - 1788 (1974).

FRITZ, P.J., E.S. VESELL, E.L. WHITE and K.M. PRUITT: The Roles of Synthesis and Degradation in Determining Tissue Concentrations of Lactate Dehydrogenase-5.
Proc. Nat. Acad. Sci. 62, 558 - 565 (1969).

FRITZ, P.J., E.L. WHITE, K.M. PRUITT and E.S. VESELL: Lactate Dehydrogenase Isoenzymes. Turnover in Rat Heart, Sceletal Muscle, and Liver.
Biochemistry 12, 4034 - 4039 (1973).

FRUTON, J.S.: The Specifity of Proteinases toward Protein Substrates in E. REICH, D.B. RIFKIN and E. SHAW: Proteases and Biological Control, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory 1975.

GLASER, L. and D.H. BROWN: Purification and Properties of D-Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase.
Journ.Biol.Chem. 216, 67 - 79 (1955)

GLASS, R.D. and D. DOYLE: On the Measurement of Protein Turnover in Animal Cells. Journ. Biol. Chem. 247, 5234 - 5242 (1972).

GOLDBERG, A.L.: Correlation between Rates of Degradation of Bacterial Proteins in vivo and their Sensitivity to Proteases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2640 - 2644 (1972)

GOLDBERG, A.L. and J.F. DICE: Ultracellular Protein Degradation in Mammalian and Bacterial Cells. Ann. Rev. of Biochem. 43, 835 - 869 (1974).

GOLDBERG, A.L. and A.C. ST.JOHN: Intracellular Protein Degradation in Mammalian and Bacterial Cells: Part. 2. Ann. Rev. of Biochem. 45, 747 - 803 (1976).

GOLDSPINK, D.F.: Protein Turnover of Rat Skeletal Muscle after Denervation, p. 183 - 190 in V.TURK and N.MARKS, ed. Intracellular Protein Catabolism II, New York and London: Plenum Press 1977.

GREEN, D.E., L.F. LELOIR and V. NOCITO: Transaminases.
Journ. Biol. Chem. 161, 559 - 582 (1945).

GREIN, L. und G. PFLEIDERER: Über die Glutamat - Pyruvat - Transaminase aus Schweineherzen.
Biochem. Z. 330, 433 - 445 (1958).

GRUBER, W., K. WARZECHA, G. PFLEIDERER und TH. WIELAND: Bedeutung von SH-Gruppen für die enzymatische Aktivität, II. Zur Selbstreaktivierung von Milchsäuredehydrogenase nach Vergiftung durch Quecksilberreagenzien.
Biochem. Z. 336, 107 - 117 (1962).

GROSSWEINER, L.I.: Photochemical Inactivation of Enzymes.
Curr. Top. Radiat. Res. Q. 11, 141 - 199 (1976).

HACKERT, M.L., G.C. FORD and M.G. ROSSMANN: Molecular Orientation and Position of the Pig M_4 and H_4 Isoenzymes of Lactate Dehydrogenase in their Crystal Cells.
J. Mol. Biol. 78, 665 - 673 (1973).

HÄCKER, M.R., E.KRÜGER und H.M. AUGUSTIN: Über eine einfache Methode zur Bestimmung der Kreatinkinase (ATP:Kreatin-Phosphotransferase, E.C.2.7.3.2) im Serum.
Z. med. Labortechnik 8, 259 - 273 (1967).

HANSON, H., H. KIRSCHKE, J. LANGNER, B. WIEDERANDERS, S. ANSORGE and P. BOHLEY: Intracellular Protein Catabolism in Vitro and in Vivo, in V.TURK and N. MARKS, ed.: Intracellular Protein Catabolism II, p. 1 - 11, New York and London: Plenum Press 1977.

HARRIS, H., D.A. HOPKINSON and J. LUFFMANN: Enzyme Diversity in Human Populations. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151, 232 - 242 (1968).

HEIL, A., G. MÜLLER, L.NODA, TH. PINDER, H. SCHIRMER, I. SCHIRMER and I.von ZABERN: The Amino-Acid Sequence of Porcine Adenylate Kinase from Skeletal Muscle.
Eur. J. Biochem. 43, 131 - 144 (1974)

HELLER, W.: Reversible Aggregations of Colloidal Particles.I. Centrifugal Experiments on Thixotropic Iron oxide Sols. Journ. Phys. Chem. 45, 1203 - 1227 (1941).

HOFFMEISTER, H. und B. JUNGE: Über die Haltbarkeit von Serumbestandteilen und die Zuverlässigkeit ihrer Bestimmung im Autoanalyser SMA 12/30 - Survey. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6, 613 - 617 (1970).

HOFSTEE, B.H.J.: Alkaline Phosphatase. I. Mechanism of Action of Zn, Mg, Glycine, Versene, and Hydrogen Ions. Arch. Biochem. Biophys. 59, 352 - 365 (1955).

HOLBROOK, J.J., G. PFLEIDERER, J. SCHNETGER and S. DIEMAIR: The Importance of SH-Groups for Enzymic Activity. IV. Preparation of the Tryptic Peptides Containing the Essential Cysteine Residues of Lactate Dehydrogenase Isozymes I und V. Bioch. Z. 344, 1 - 14 (1966).

HOLBROOK, J.J., G. PFLEIDERER, K. MELLA, M. VOLZ, W. LESKOWAC, and R. JECKEL: The Importance of SH-Groups for Enzymic Activity. 7. The Amino Acid Sequenze around the Essential SH-Group of Pig Heart Lactic Dehydrogenase, Isoenzyme I.
Eur. J. Biochem. 1, 476 - 481 (1967).

HOLBROOK, J.J., and R. JECKEL: Reversible, Covalent Modification of the Essentiel Cysteine Residues of Pig Heart Lactate Dehydrogenase.
Arch. Biochem. Biophys. 122, 519 - 521 (1968).

HOLBROOK, J.J., A. LILJAS, S.J. STEINDEL and M.G. ROSSMANN: Lactate Dehydrogenase in P.D. BOYER, The Enzymes 11, 191 - 292, third edition, New York, San Francisco, London: Academic Press 1975.

HOPGOOD, M. F. and F.J. BALLARD: The Relative Stability of Liver Cytosol Enzymes Incubated in Vitro.
Biochem. J. 144, 371 - 376 (1974).

HOPPE - SEYLER und THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse.
10 Aufl. Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York: Springer 1964 + 1966.

HUGHES, R.C., W.T. JENKINS and E.H. FISCHER: The Site of Binding of Pyridoxal-5'-Phosphate to Heart Glutamic-Aspartic Transaminase.
Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1615 - 1618 (1962)

HÜTTENRAUCH, R. und I. KEINER: Inaktivierung des Pepsins beim Verpressen - Mechanische Denaturierung der Proteine.
Pharmazie 31, 575 (1976).

JENKINS, W.T., D.A. YPHANTIS, and J.W. SIZER: Glutamic Aspartic Transaminase.
I. Assay, Purification and General Properties.
Journ. Biol. Chem. 234, 51 - 57 (1959).

JOLY, M.: A physicochemical Approach to the Denaturation of Proteins, New York and London: Academic Press 1965.

JOSEPHS, R. and W.F. HARRINGTON: An Unusual Pressure Dependence for a Reversibly Associating Protein System. Sedimentation Studies on Myosin. Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 1587 - 1594 (1967).

JULIAN, G.R., R.G. WOLFE and F.J. REITHEL: The Enzymes of Mammary Gland. II. The Preparation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Journ. Biol. Chem. 236, 754 - 758 (1961).

JUNG, K., K.D. GRÜTZMANN, E. EGGER and C. FECHNER: Suitability of Commercial Enzyme Control Sera for the Quality control of Activity Determinations of L-Aspartate Aminotransferase and L-Alanine Aminotransferase in Human Serum. Clin. Chim. Acta 79, 515 - 526 (1977).

KAGAMIYAMA, H., R. SAKAKIBARA, H. WADA, S. TANASE, and Y. MORINO: The Complete Amino Acid Sequence of Mitochondrial Aspartate Aminotransferase from Pig Heart. J. Biochem. 82, 291 - 294 (1977).

KAPLAN, N.O.: Lactate Dehydrogenase - Structure and Function.
Brookhaven Symposia in Biology 17, 131 - 153 (1964).

KARMEN, A., F. WRÓBLEWSKI, and J.S. LA DUE: Transaminase Activity in Human Blood.
J. Clin. Invest. 34, 126 - 133 (1955).

KASSAB, R., C. ROUSTAN et L.A. PRADEL: Site actif des ATP: Guanidine Phosphotransférases I. Réaction des Groupes ε - NH_2 Lysine Essentiels avec le I-Diméthylaminonaphtalène-5-sulfochlorure.
Biochim. Biophys. Acta 167, 308 - 316 (1968).

KASSELL, B. and J. KAY: Zymogens of Proteolytic Enzymes.
Science 180, 1022 - 1027 (1973).

KATUNUMA, N.: Enzyme Degradation and its Regulation by Group - Spezific Proteases in Various Organs of Rats.
Curr. Top. Cell. Reg. 7, 175 - 203 (1973).

KIEF, W., B. KLEIN und E. MÖLLER: Enzym - Bewegungen unter körp. Belastung bei trainierten u. untrainierten Probanden.
Med. Klin. 67, 195 - 199 (1972).

KEUTEL, H.J., K. OKABE, H.K. JACOBS, F. ZITER, L. MALAND and S.A. KUBY: Studies on Adenosine Triphosphate Transphosphorylases. XI. Isolation of the Crystalline Adenosine Triphosphate Creatine Transphosphorylases from the Muscle and Brain of Man, Calf and Rabbit; and Preparation of their Enzymatically Active Hybrids. Arch. Biochem. Biophys. 150, 648 - 678 (1972).

KIM, E. K., F.H. PRYCE and J.E. LOGAN: An Investigation of Factors Influencing the Measurement of Creatine Phosphokinase Activity in Serum Using Coupled Enzymatic Methods. Clin. Biochem. 11, 3 - 9 (1978).

KIRKMAN, H.N. and E.M. HENDRICKSON: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes. II. Subactive States of the Enzyme from Normal Persons. Journ. Biol. Chem. 237, 2371 - 2376 (1962).

KITTO, G. B., P.H. WASSARMAN and N.O. KAPLAN: Enzymatically Active Conformers of Mitochondrial Malate Dehydrogenase.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 56, 578 - 585 (1966).

KREUTZER, H.H. and W.H.S. FENNIS: Lactic Dehydrogenase Isoenzymes in Blood Serum after Storage at Different Temperatures.
Clin. Chim. Acta 9, 64 - 68 (1964).

KREUTZER, H.H. and P.H. EGGELS: LDH Isoenzymes after Electrophoretic Separation on Agar Gels Prepared from Different Kinds of Agar.
Clin. Chim. Acta 12, 80 - 88 (1965).

KUBY, S. A., L. NODA and H.A. LARDY: Adenosinetriphosphate - Creatine Transphosphorylase. I. Isolation of the Crystalline Enzyme from Rabbit Muscle.
Journ. Biol. Chem. 209, 191 - 201 (1954a).

KUBY, S. A., L. NODA and H.A. LARDY: Adenosinetriphosphate - Creatine Transphosphorylase. III. Kinetic Studies.
Journ. Biol. Chem. 210, 65 - 82 (1954b).

KUBY, S. A. and E.A. NOLTMANN: ATP - Creatine Transphosphorylase in P.D. BOYER, H. LARDY, K. MYRBÄCK, ed. The Enzymes 6, 515 - 603, 2. Edition. New York and London: Academic Press 1962.

LATNER, A.L. and A.W. SKILLEN: Isoenzymes in Biology and Medicine. London and New York: Academic Press 1968.

LAZARONI, J.A.Jr., E.C. MAIER and L.R. GORCZYCA: The Stability of Lactic Dehydrogenase in Serum. Clin. Chem. 4, 379 - 381 (1958).

LEBEDEVA, A.F. and L.A. MAROKUSHKIN: On the Mechanism Underlying the Disturbance of the Neuromuscular System under the Effect of Vibration. Gig. Trud. Prof. Zab. 14, 15 - 18 (1970).

LEBHERZ, H.G.: Stability of Quaternary Structure of Mammalian and Avian Fructose Diphosphate Aldolases. Biochemistry 11, 2243 - 2250 (1972).

LEVI, A. S. and N.O. KAPLAN: The Role of the Reduced Diphosphopyridine Nucleotide in the Reactivation of Dogfish Muscle Lactate Dehydrogenase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 1615 - 1621 (1971).

LEWIS, P. S.: CXVIII. The Kinetics of Protein Denaturation Part I. The Effect of Variation in the Hydrogen Ion Concentration on the Velocity of the Heat Denaturation of Oxyhaemoglobin. Biochem. J. 20, 965 - 977 (1926)

LEWIS, P. S.: CXIX. The Kinetics of Protein Denaturation Part II. The Effect of Variation in the Hydrogen Ion Concentration on the Velocity of the Heat Denaturation of Egg-Albumin; the Critical Increment of the Process. Biochem. J. 20, 978 - 983 (1926).

LUI, N.S.T. and L. CUNNINGHAM: Cooperative Effects of Substrates and Substrate Analogs on the Conformation of Creatine Phosphokinase. Biochemistry 5, 144 - 149 (1966).

LUMRY, R. and H. EYRING: Conformation Changes of Proteins.
J. Phys. Chem. 58, 110 - 120 (1954).

LUZATTO, L. and and N.C. ALLAN: Differential Properties of Glucose-6-phosphat Dehydrogenase from Human Erythrozytes with Normal and Abnormal Enzyme Levels.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 547 - 554 (1965).

MacRITSCHIE, F.: Collapse of Protein Monolayers.
Journ. Coll. Sci. 18, 555 - 561 (1963)

MACCALLUM, R.N., E.C. LYNCH, J.D. HELLUMS and C.P. ALFREY,Jr.: Fragility of abnormal Erythrozytes evaluated by Response to Shear Stress.
J. Lab. Clin. Med. 85, 67 - 74 (1975).

MADELIAN, V. and W.A. WARREN: Modification of the Sulfhydryl Groups of Creatine Kinase by Urate.
Clin. Chem. 23, 1119 (1977).

MAHOWALD, TH.: The Amino Acid Sequence Around the "Reactive" Sulfhydryl Groups in Adenosine Triphosphocreatine Phosphotransferase.
Biochemistry 4, 732 - 740 (1965).

MARKS, P.A., A. SZEINBERG and J. BANKS: Erythrocyte Glucose-6-phosphate Dehydrogenase of Normal and Mutant Human Subjects. Properties of the Purified Enzymes.
Journ. Biol. Chem. 236, 10 - 17 (1961).

MARKUS, G.: Protein Substrate Conformation and Proteolysis.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 54, 253 - 258 (1965).

MARSHALL, J.J. and M.L. RABINOWITZ: Enzyme Stabilization by Covalent Attachment of Carbohydrate.
Arch. Biochem. Biophys. 167, 777 - 779 (1975).

MARTINEZ-CARRION, M., C. TURANO, E. CHIANCONE, F. BOSSA, A. GIARTOSIO, F. RIVA and P. FASELLA: Isolation and Characterisation of Multiple Forms of Glutamate-Aspartate Aminotransferase from Pig Heart.
Journ. Biol. Chem. 242, 2397 - 2409 (1967).

MATHER, J.H. and T.W.KEENAM:The Stability of Alkaline Phosphatase in Sodium Dodecyl Sulfate.
FEBS Lett. 44, 79 - 82 (1974).

MICHIE, D. D., R.W. BOOTH, M. CONLEY and H.J. Mc GUIRE: The Effect of Quick Freezing on the Preservation of Selected Serum Enzyme Activities. Am. J. Clin. Path. 52, 329 - 334 (1969).

MILLAR, D.B., M.R. SUMMERS and J.A. NIZIOLEK: Spontaneous in Vitro Hybridisation of LDH Homopolymers in the Denaturated State. Nature New Biol. 230, 117 - 119 (1971).

MILNER-WHITE, E.J. and D.C. WATTS: Inhibition of Adenosin-5'-Triphosphate-Creatine Phosphotransferase by Substrate-Anion Complexes. Biochem. J. 122, 727 - 740 (1971).

MISZCZAK, M., M. SZYMONA and R. JAKUBOWSKI: Effect of Mechanical Vibration on the Induction of L-Serin Dehydratase in Rat Liver. Physiol. Chem. Phys. 6, 367 - 369 (1974).

MORIN, L.G.: Creatine Kinase: Stability, Inactivation, Reactivation. Clin. Chem. 23, 546 - 652 (1977)

MOSLEY, J.W. and R.F. GOODWIN: Stability of Serum Glutamic Pyruvic Transaminase Activity on Storage.
Am. J. Clin. Path. 44, 591 - 595 (1965).

NEALON, D.A. and A.R. HENDERSON: Stability of Commonly Used Thiols and of Human Creatine Kinase Isoenzymes during Storage at Various Temperatures in Various Media.
Clin. Chem. 23, 816 - 829 (1977).

NEGELEIN, E. und W. GERISCHER: Verbesserte Methode zur Gewinnung des Zwischenferments aus Hefe.
Biochem. Z. 284, 289 - 296 (1936).

NISSELBAUM, J.S. and O. BODANSKY: Kinetics and Electrophoretic Properties of the Isoenzymes of Aspartate Aminotransferase from Pig Heart.
Journ. Biol. Chem. 241, 2661 - 2664 (1966).

NODA, L.: Nucleoside Triphosphate - Nucleoside Monophosphokinases in P.D. BOYER, H. LARDY and K. MYRBÄCK, The Enzymes 6, 139 - 149, second edition, New York and London: Academic Press 1962.

NODA,L. : Adenylate Kinase in The Enzymes 8, 279 - 305 P.D. BOYER, ed., 3. edition, London and New York: Academic Press 1973.

NODA,L. and S.A. KUBY: Adenosine Triphosphate - Adenosine Monophosphate Transphosphorylase (Myokinase). I. Isolation of the Crystalline Enzyme from Rabbit Skeletal Muscle. II. Homogeneity Measurements and Physicochemical Properties. Journ. Biol. Chem. 226, 541 - 558 (1957).

NOLTMANN, E.A., C.J. GUBLER and S.A. KUBY: Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase (Zwischenferment). I. Isolation of the Crystalline Enzyme from Yeast. Journ. Biol. Chem. 236, 1225 - 1230 (1961).

NOZAKI, Y. and CH. TANFORD: The Solubility of Amino Acids and Related Compounds in Aqueous Urea Solutions. Journ. Biol. Chem. 238, 4074 - 4081 (1963).

OKUNUKI, K.: Denaturation and Inactivation of Enzyme Proteins. Adv. Enzymol. 23, 29 - 82 (1961).

OVCHINNIKOV, Y.A., C.A. EGEROV, N.A. ALDANOVA, M.Y. TEIGINA, V.M. LIPKIN, N.G. ABDULAEV, E.V. GRISHIN, A.P. KISELEV, N.N. MODYANOV, A.E. BRAUNSTEIN, O.L.POLYANOVSKY, and V.V. NOSIKOV: The Complete Aminoacid Sequence of Cytoplasmic Aspartate Aminotransferase from Pig Heart.
FEBS Letters 29, 31 - 34 (1973).

PACE, C.W.: The Stability of Globular Proteins.
Crit. Rev. Biochem. 1, 1 - 43 (1975).

PÄTAU, K. : Zur statistischen Beurteilung von Messreihen (Eine neue t-Tafel).
Biol. Zentralblatt 63, 152 - 168 (1943).

PAZUR, J.H. and N.N. Aronson, Jr.: Glycoenzymes: Enzymes of Glycoprotein Structure.
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 27, 301 - 341 (1972).

PAZUR, J.H., H.R. KNULL and D.L. SIMPSON: Glycoenzymes: A Note on the Role for the Carbohydrate Moieties.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, 110 - 116 (1970).

PENNISTON, J.T.: High Hydrostatic Pressure and Enzymatic Activity: Inhibition of Multimeric Enzymes by Dissoziation. Arch. Biochem. Biophys. 142, 322 - 332 (1971).

PESCE, A., T.P. FONDY, F. STOLZENBACH, F. CASTILLO,and N.O. KAPLAN: The Comparative Enzymology of Lactic Dehydrogenase. III. Properties of the H_4 and M_4 Enzymes from a Number of Vertebrates. Journ. Biol. Chem. 242, 2151 - 2167 (1967).

PFLEIDERER, G. und E.D. WACHSMUTH: Die Heterogenität der Lactatdehydrogenase in Entwicklungsgeschichte und Pathologie des Menschen. Klin. Wschr. 39, 352 - 354 (1961).

PICKLES, B. and B.A. JEFFERY: Some Preliminary Results for the Crystal Structure of Lactic Dehydrogenase. J. Mol. Biol. 9, 598 - 600 (1964).

PINE, M. J.: Turnover of Intracellular Proteins. Ann. Rev. Microbiol. 26, 103 - 126 (1972).

POLYANOVSKII, O.L., Yu.A. ZAGYANSKII and L.A. TUPERMAN: Molecular Parameters and Structure of Aspartate Transaminase and its Subunits.
Mol. Biol. 4, 369 - 379 (1970).

POSEN, S., C.J. CORNISH, M. HORNE and P.K. SAINI: Placental Alkaline Phosphatase and Pregnancy.
Ann. N.Y. Acad. Sci., Part V. Clin. Enzymol. p. 733 - 744 (1968 + 1969).

PRADEL, L.A. et R. KASSAB: Site actif des ATP: Guanidine phosphotransférases. II. Mise en évidence de résidus histidine essentiels au moyen du pyrocarbonate d'éthyle.
Biochim. Biophys. Acta 167, 317 - 325 (1968).

PRITCHARD, N.J., D.E. HUGHES and A.R. PEACOCKE: The Ultrasonic Degradation of Biological Macromolecules under Conditions of Stable Cavitation. I. Theory, Methods, and Application to Deoxyribonucleic Acid.
Biopolymers 4, 259 - 273 (1966).

RAPLEY, S.: Studies on the Biochemical Genetics of Human Adenylate Kinase. University of London: Thesis 1968.

RAUEN. H.M.: Biochemisches Taschenbuch, 2. Auflage, Göttingen. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1964.

REITHEL, F.J.: The Dissoziation and Assoziation of Protein Structures. Adv. Prot. Chem. 18, 123 - 226 (1963).

RICHARDS, F.M. and P.J. VITHAYATHIL: Peptide-Protein Interactions in Ribonuclease-S. Brookh. Symp. Biol. 13, 115 - 134 (1960).

ROLLO, J.L., J.E. DAVIS, J.H. LADENSON, J.M. McDONALD and D.E. BRUNS: Effects of β-Mercaptoethanol and Chelating Agents on the Stability and Activation of Creatine Kinase in Serum. Clin. Chim. Acta 87, 189 - 198 (1978).

ROMANOV, S.N., R.A. ARTSISHEVSKAYA and V.A. MUZHEYEV: Change in Enzymatic Activity of Myosin under the Influence of Low-Frequence Mechanical Vibration. Biofizika 14, 233 - 239 (1969).

ROSALKI, S.B.: An Improved Procedure for Creatine Phosphokinase Determination.
J. Lab. Clin. Med. 69, 696 - 705 (1967).

ROSSMANN, M.G., B.A. JEFFERY, P. MAIN, and S. WARREN: The Crystal Structure of Lactic Dehydrogenase.
Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 515 - 524 (1967).

ROTTHAUWE, H.-W. und M. CERQUEIRO: Die Haltbarkeit der Serum-Kreatin-Phosphokinase.
Klin. Wschr. 41, 876 - 878 (1963).

RUDOLPH, R., I. HEIDER, E. WESTHOF and R. JAENICKE: Mechanism of Refolding and Reactivation of Lactic Dehydrogenase from Pig Heart after Dissociation in Various Solvent Media.
Biochemistry 16, 3384 - 3390 (1977).

SAIER, M.H., JR. and W.T. JENKINS: Alanine Aminotransferase. I. Purification and Properties.
Journ. Biol. Chem. 242, 91 - 100 (1967).

SANDIFORT, C.R.J.: Effects of Ethylenediaminetetraacetate on "CK-NAC" Reagent Stability and Measured Creatine Kinase Activities.
Clin. Chem. 23, 2169 - 2170 (1977).

SCHERAGA, H.A.: Intramolecular Bonds in Proteins. II. Noncovalent Bonds, in The Proteins, H. NEURATH, ed., second ed. Vol. I p. 477 - 594, New York and London: Academic Press 1963.

SCHIMKE, R.T.: Regulation of Protein Degradation in Mammalian Tissues in H.N. MUNRO, ed. Mammalian Protein Metabolism 4, 177 - 228, New York and London: Academic Press 1970.

SCHMID, G., H.-D. LÜDEMANN, and R. JAENICKE: Oxidation of Sulfhydryl Groups in Lactic Dehydrogenase under High Hydrostatic Pressure. Eur. J. Biochem. 86, 219 - 224 (1978).

SCHMID, R.D.: Stabilized Soluble Enzymes in T.K. GHOSE, A. FIECHTER, N. BLAKEBROUGH ed. Advances in Biochemical Engineering 12, 41 - 118, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1979.

SCHMIDT, E. und F.W. SCHMIDT: Untersuchungen über die Alterung von Enzymen in vitro. IV. Mitteilung: Zur Methodik von Enzym-Bestimmungen in menschlichen Organ-Extrakten und in Serum. Enzymol, biol. clin. 3, 80 - 86 (1963).

SCHMIDT, E. und F.W. SCHMIDT: Kleine Enzym-Fibel, 2. Aufl., Mannheim: Boehringer Mannheim GmbH 1976.

SCHONHORN, H.: Heterogenous Nucleation of Polymer Melts on Surfaces. I. Influences of Substrates on Wettability. J. Polymer Sci. 5B, 919-924 (1967).

SCHONHORN, H.: Heterogenous Nucleation of Polymer Melts on Surfaces. II. Effect of Substrate on Morphology and Wettability. Macromolecules 1, 145 - 151 (1968).

SCHULZ, G.E., M. ELZINGA, F. MARX and R.H. SCHIRMER: Three-Dimensional Structure of Adenylkinase. Nature 250, 120 - 123 (1974).

SEGAL, H.L., T. MATSUZAWA, M. HAIDER and G.J. ABRAHAM: What Determines the Halflive of Proteins in Vivo? Some Experiences with Alanine Aminotransfetase of Rat Tissues. Bioch. Biophys. Res. Comm. 36, 764 - 770 (1969).

STRAUB, F.B.: Crystalline Lactic Dehydrogenase from Heart Muscle. Biochem. J. 34, 483 - 486 (1940).

SÜDHOF, H. und E. WÖTZEL: Über die Haltbarkeit von zur Enzymaktivitätsbestimmung vorgesehener Serumproben.
Klin. Wschr. 38, 1165 - 1167 (1960).

SUZUKI, A. and S. GOTO: Surface Films of Protein and a Protein-Lipopolysaccharide Complex Extracted from Pseudomonas Aeruginosa.
Biochim. Biophys. Acta 255, 734 - 743 (1972).

TANFORD, Ch.: Protein Denaturation
Adv. Protein Chem. 23, 121 - 282 (1968).

TAYLOR, H.: Transaminase in M.M. FRIEDMAN, and R.M. and D. SELIGSON ed.
Stand. Meth. Clin. Chem. 3, 207 - 216 (1961).

THACKER, J.: An Approach to the Mechanism of Killing Cells in Suspension by Ultrasound.
Biochim. Biophys. Acta 304, 240 - 248 (1973).

THOMAS, D.M. and H.HARRIS:Comparison of Thermostabilities of Different Human Placental Alkaline Phosphatase Phenotypes.
Ann. Hum. Genet. Lond. 35, 221 - 224 (1971).

THOMPSON, A.R., I.W. EVELEIGH and B.J. MILES: Amino-Acid Sequence araound the Reactive Thiol Groups of Adenosine-Triphosphate-Creatine Phosphotransferase.
Nature 203, 267 - 269 (1964).

THOMPSON, W.H.S.: An Investigation of Physical Factors Influencing the Behaviour in Vitro of Serum Creatine Phosphokinase and other Enzymes.
Clin. Chim. Acta 23, 105 - 120 (1969).

TIRRELL, M. and S. MIDDLEMAN: Shear Modification of Enzyme Kinetics.
Biotechnology and Bioengineering 17, 299 - 305 (1975).

TIRRELL, M. and S. MIDDLEMAN: Shear Deformation Effects on Enzyme Catalysis: Preliminary Experimental Results on Lactic Dehydrogenase.
Biotechnology and Bioengineering 20, 605 - 610 (1978).

TODD, J.K. and D.W. BARON: Adenylate Kinase in Human Tissues.
London: Pittman Medical 1965.

TORCHINSKII, Y.M.: Spectral Properties of Alanine-Glutamate Transferase.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 138, 1464 - 1466 (1961).

TORCHINSKII, Y.M.: Sulfhydryl and Disulfid Groups of Proteins. Chapter 7, p. 207,
New York and London: Consultants Bureau 1974.

TORCHINSKII, Y.M. and A.E. BRAUNSHTEIN: Role of Sulfhydryl Groups in Maintenance of the Catalytically Active Structure of Aspartate-Glutamate Transaminase.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 148,30 - 33 (1963).

TRAUB, W. and P. FIETZEK: Contribution of the α_2-Chain to the Molecular Stability of Collagen.
FEBS Letters 68, 245 - 249 (1976).

TROTMAN, C.N. and C. GREENWOOD: Zinc-Dependent Conformational Stability in the Alkaline Phosphatase of Escherichia Coli.
Biochem. J. 114, 82P - 83P (1969).

TSVETKOV, D., and T. POPOV: The Effect of High-Frequency Vibration on the Activity of some Enzymes (Cytochrome Oxydase, Catalase, Peroxydase) Participating in Biological Oxydation in Experiment. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology 17, 169 - 175 (1973).

UCHIDA, T., A.M. PAPPENHEIMER, JR. and A.A. HARPER: Diphteria Toxin and Related Proteins. III. Reconstitution of Hybrid "Diphteria Toxin" from Nontoxic Mutant Proteins. Journ. Biol. Chem. 248, 3851 - 3854 (1973).

VALLEY, B.L. and D.D. ULMER: Biochemical Effects of Mercury, Cadmium and Lead. Ann. Rev. Biochem. 41, 92 - 128 (1972).

VESELL, E.S. and K.L. YIELDING: Protection of Lactate Dehydrogenase Isozymes from Heat Inactivation and EnzymaticDegradation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151, 678 - 689 (1968).

WACHSMUTH, E.D., G. PFLEIDERER und TH. WIELAND: Aminosäurenzusammensetzung von Isozymen der Lactatdehydrogenase aus menschlichen und tierischen Organen. Biochem. Z. 340, 80 - 94 (1964).

WARBURG, O. und W. CHRISTIAN: Über Aktivierung der Robison'schen Hexose-Mono-Phosphorsäure in roten Blutzellen und die Gewinnung aktivierender Fermentlösungen.
Biochem. Z. 242, 206 - 227 (1931).

WARBURG, O. und W. CHRISTIAN: Über ein neues Oxydationsferment und sein Absorptionsspektrum.
Biochem. Z. 254, 438 - 458 (1932).

WARSHEL, A. and M. LEVITT: Folding and Stability of Helical Proteins: Carp Myogen.
J. Mol. Biol. 106, 421 - 437 (1976).

Watts, D.C.: Evidence about the Role of the Essential Thiol Groups in Creatine Kinase from Differential Thermal Analysis.
Biochem. J. 100, 13C - 14C (1966).

WATTS, D.C.: Creatine Kinase in P.D. BOYER, The Enzymes 8, 383 - 455, third Edition, New York, San Francisco, London: Academic Press 1973.

WATTS, D.C.: and B.R. RABIN: A Study of the 'Reactive' Sulfhydryl-Groups of Adenosine 5'-Triphosphate-Creatine Phosphotransferase.
Biochem. J. 85, 507 - 516 (1962).

WEISS, L. and L.E. BLUMENSON: Dynamic Adhesion and Separation of Cells in Vitro. II. Interactions of Cells with Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces. Journ. Cell. Phyiol. 70, 23 - 32 (1967).

WESTHEAD, E.W.: Dye-Sensitized Photooxidation in: Methods in Enzymology 25B, 401 - 409 C.H.W. HIRS and S.N. TIMASHEFF ed. New York and London: Academic Press 1972 .

WIEDERANDERS, B., S. ANSORGE, P. BOHLEY, H.KIRSCHKE, J. LANGNER and H. HANSON: The Age Dependence of Intracellular Proteolysis in Rat Liver p. 144 - 147 in V. TURK and N. MARKS, ed. Intracellular Protein Catabolism II, New York and London:Plenum Press 1977 .

WILKINSON, J.H.: An Introduction to Diagnostic Enzymology, p. 106. Baltimore: Williams and Wilkins, 1962.

WRÓBLEWSKI, F. and K.F. GREGORY: Lactic Dehydrogenase Isozymes and their Distribution in Normal Tissues and Plasma and in Disease States.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 912 - 932 (1961).

WÜST, H., E. ARNOLD und H. SCHÖN: Die thermische Inaktivierung von Serum- und Organlactatdehydrogenasen als Methode zur Isoenzymtrennung.
Klin. Wschr. 43, 500 - 504 (1965).

YUE, R.H., R.H. PALMIERI, O.E. OLSON, and S.A. KUBY: Studies on Adenosine Triphosphate Transphosphorylases. V.Studies on the Polypeptid Chains of Crystalline Adenosine Triphosphate-Creatine Transphosphorylase from Rabbit Skeletal Muscle.
Biochem. 6, 3204 - 3227 (1967).

ZSIGMONDY, R.: Kolloidchemie
I. Allgemeiner Teil, 5. Auflage
Leipzig: Otto Spamer Verlag 1925.

H. Abkürzungsverzeichnis

0,9% NaCl	physiologische Kochsalzlösung
PS	Patientenserum
S_j	Schüttelbehandlungen: S_1, S_2, S_3, S_4; jede Schüttelbehandlung wird charakterisiert durch eine entsprechende gleichbenannte Stichprobe
S_1	ungeschüttelte Stichprobe eines in 0,9% NaCl oder in PS gelösten Enzyms
S_2	0,5min geschüttelte Stichprobe
S_3	1min geschüttelte Stichprobe
S_4	2min geschüttelte Stichprobe
n	Stichprobenumfang: Stichprobe besteht aus n Varianten{$\bar{x}$, s^2, s; $s^2_{\bar{x}}$, $s_{\bar{x}}$; $s/\bar{x}\%$}Allgemein-Bezeichnungen Mittelwert, Varianz und Streuung der n Varianten; Varianz und Streuung des Mittelwerts; auf den Mittelwert bezogene relative Streuung in %
A_4	eine der n Aktivitäten <u>nach</u> S_4
A'_4	eine der n normierten Aktivitäten <u>nach</u> S_4
$\bar{A}_4$ bzw $\bar{A}'_4$	entsprechende Mittelwerte aus n Varianten
$\Delta A'_{14}=A'_1-A'_4$	einer der n normierten Aktivitätsverluste <u>zwischen</u> S_1 und S_4

$\bar{A}'$ eine der n gemittelten normierten Aktivitäten <u>während</u> S_j

$\bar{\bar{A}}'$ Mittelwert der n durchschnittlichen normierten Aktivitäten $\bar{A}'$

A_{4P} eine der n Aktivitätszahlen in PS <u>nach</u> S_4

A'_{4P} eine der n normierten Aktivitätszahlen in PS <u>nach</u> S_4

$\bar{A}_{4P}$ bzw $\bar{A}'_{4P}$ entsprechende Mittelwerte aus n Varianten

$\bar{A}'_P$ eine der n gemittelten, normierten Aktivitätszahlen in PS <u>während</u> S_j

$\bar{\bar{A}}'_P$ Mittelwert der n durchschnittlichen normierten Aktivitäten $\bar{A}'_P$

A_{4H} eine der n=9 Aktivitäten bei LDH-Herz <u>nach</u> S_4

A_{4M} eine der n=12 Aktivitäten bei LDH-Muskel <u>nach</u> S_4

$\Delta A'_{14H}$ einer der n=9 normierten Aktivitätsverluste bei LDH-Herz zwischen S_1 und S_4

$\Delta A'_{14M}$ einer der n=12 normierten Aktivitätsverluste bei LDH-Muskel <u>zwischen</u> S_1 und S_4

$\bar{A}'_H$ eine der n=9 gemittelten normierten Aktivitäten bei LDH-Herz <u>während</u> S_j

$\bar{A}'_M$ eine der n=12 gemittelten normierten Aktivitäten bei LDH-Muskel <u>während</u> S_j

A_{4PH} eine der n=4 Aktivitäten bei LDH-Herz in PS <u>nach</u> S_4

A_{4PM} eine der n=4 Aktivitäten bei LDH-Muskel in PS nach S_4

A'_{4PH} eine der n=4 normierten Aktivitäten bei LDH-Herz in PS nach S_4

$\Delta A'_{14PH}$ eine der n=4 normierten Aktivitätsverluste bei LDH-Herz in PS zwischen S_1 und S_4

$\bar{A}'_{PH}$ eine der n=4 gemittelten normierten Aktivitäten bei LDH-Herz in PS während S_j

Definitionen und Erklärungen einiger Beispiele von Differenzausdrücken, die bei den durchgeführten t-Testen verwendet wurden:

1) Innerhalb der Betrachtung eines Enzyms E_1 wird definiert:

$$\bar{A}'_{E1} = \bar{A}' = (A'_1 + A'_2 + A'_3 + A'_4) : 4$$

$$\bar{\bar{A}}'_{E1} = \bar{\bar{A}}' = (\bar{A}'_1 + \bar{A}'_2 + \bar{A}'_3 + \bar{A}'_4) : 4 \approx (\sum_1^n \bar{A}') : n$$

2) Beispiele für den Vergleich zweier Enzyme E_2 und E_1

$(\bar{A}'_{4E2} - \bar{A}'_{4E1}) \hat{=} \bar{A}'_{42} - \bar{A}'_{41}) = d_{12}$ Differenz der Mittelwerte aller A'_{4E2} und aller A'_{4E1}

$(\bar{\bar{A}}_{E2} - \bar{\bar{A}}_{E1}) \hat{=} (\bar{\bar{A}}_2 - \bar{\bar{A}}_1) = d_{12}$ Differenz der Mittelwerte aller $\bar{\bar{A}}'_{E2}$ und aller $\bar{\bar{A}}'_{E1}$

3) Analoge Differenzen "d_{12}":

$(\bar{A}_{4P} - \bar{A}_4)$ Differenz der Mittelwerte aller A_{4P} und aller A_4

$(\bar{A}'_{4P} - \bar{A}'_4)$ Differenz der Mittelwerte aller A'_{4P} und aller A'_4

$(\bar{\bar{A}}'_P - \bar{\bar{A}}')$ Differenz der Mittelwerte aller $\bar{\bar{A}}'_P$ und aller $\bar{\bar{A}}'$

$(\bar{A}_{4H} - \bar{A}_{4M})$ Differenz der Mittelwerte aller A_{4H} und aller A_{4M}

$(\Delta\bar{A}'_{14M} - \Delta\bar{A}'_{14H})$ Differenz der Mittelwerte aller $\Delta A'_{14M}$ und aller $\Delta A'_{14H}$

$(\bar{\bar{A}}'_H - \bar{\bar{A}}'_M)$ Differenz der Mittelwerte aller $\bar{\bar{A}}'_H$ und aller $\bar{\bar{A}}'_M$

$(\bar{A}_{4PH} - \bar{A}_{4PM})$ Differenz der Mittelwerte aller A_{4PH} und aller A_{4PM}

$(\Delta A'_{14PM} - \Delta A'_{14PH})$ Differenz der Mittelwerte aller $\Delta A'_{14PM}$ und aller $\Delta A'_{14PH}$

$(\bar{\bar{A}}'_{PH} - \bar{\bar{A}}'_{PM})$ Differenz der Mittelwerte aller $\bar{\bar{A}}'_{PH}$ und aller $\bar{\bar{A}}'_{PM}$

Lebenslauf

Am 21.02.1949 wurde ich, Johannes Martin Wertz, als Sohn des Dr. rer.nat. Ernst Wertz, Studienrat i.R. und der Helene Wertz, geb. Barth in Stuttgart geboren.

Von April 1956 bis April 1960 besuchte ich die Altenburgschule in Stuttgart, anschließend das Kepler-Gymnasium in Stuttgart (neusprachlicher Zug). Im April 1965 wechselte ich in das Zeppelin-Gymnasium über, wo ich im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zug am 21.06.1968 das Abitur ablegte.
Im Wintersemester 1968/1969 begann ich an der Universität Stuttgart das Studium der Biologie und setzte es nach dem Vordiplom (08.09.1970) an der Universität Tübingen fort. Am 11.09.1974 legte ich die Diplomprüfung ab.
Ab Sommersemester 1973 studierte ich an der Universität Tübingen Medizin. Im August 1975 bestand ich das Physikum, im August 1976 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung, im August 1978 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung, und am 13.04.1981 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.